

**Aus dem Walther–Straub–Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der
Ludwig–Maximilians–Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**Akrosomale Exozytose von Säugerspermien:
Das synaptische Multidomänenprotein RIM2 α als
molekularer Knotenpunkt eines regulatorischen
Protein–Netzwerkes**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Nele Weber
geb. Zitranski**

aus Münster (Westfalen)

2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Betreuerin:	PD. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff
Zweitgutachter:	PD. Dr. rer. nat. Alexander Faußner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	18.12.2014

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Das Spermatozoon	5
3.1.1	Aufgaben eines Spermiums.....	5
3.1.2	Morphologie eines Spermiums	6
3.1.3	Die Kapazitation	8
3.1.4	Die Akrosomreaktion.....	10
3.2	Die SNARE-Fusionsmaschinerie.....	16
3.2.1	Die SNARE-regulierte Vesikelexozytose in Neuronen.....	16
3.2.2	Die Zytomatrix der aktiven Zone	19
3.2.2.1	Munc13.....	20
3.2.2.2	RIM.....	22
3.2.2.3	RIM-Bindeproteine.....	25
3.2.2.4	Bassoon und Piccolo/Aczonin.....	26
3.2.3	SNARE-Fusion bei der akrosomalen Exozytose.....	28
3.2.3.1	Akrosomale SNARE-Komplexe	29
3.2.3.2	<i>Membrane rafts</i>	29
3.2.3.3	Das Multi-PDZ-Domänen Protein 1	31
3.3	Zielsetzung.....	32
4	Material.....	35
4.1	Chemikalien	35
4.2	Puffer, Nährmedien	37
4.3	Kits, Enzyme und Größenstandards	41
4.4	Antikörper	42
4.4.1	Primärantikörper	42
4.4.2	Sekundärantikörper	42
4.5	Primer.....	43
4.6	Bakterienstämme und Plasmide	44
4.7	Gebrauchswaren.....	45
4.8	Geräte	46
4.9	Versuchstiere	47

5 Methoden	49
5.1 Molekularbiologische Methoden	49
5.1.1 Isolierung von Ribonukleinsäure aus Hodengewebe	49
5.1.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion	49
5.1.3 Polymerasekettenreaktion	50
5.1.4 Agarosegelelektrophorese	51
5.1.5 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel	51
5.1.6 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten und Klonierungsvektoren	52
5.1.7 Ligation eines DNA-Fragments in ein Plasmid	53
5.1.8 Amplifikation von DNA in Bakterien	53
5.1.8.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	53
5.1.8.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	54
5.1.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	54
5.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA	55
5.2 Proteinbiochemische Methoden	56
5.2.1 Differentielle Zentrifugation	56
5.2.1.1 Herstellung von Zytoplasmafraktionen	56
5.2.1.2 Herstellung von Membranfraktionen	56
5.2.1.3 Harnstoffextraktion von Membran-assoziierten Proteinen	57
5.2.1.4 Anreicherung Detergens-unlöslicher Membranbestandteile	57
5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
5.2.3 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese	59
5.2.4 Immunoblot-Technik	60
5.2.5 <i>In vitro</i> Bindungsstudien	62
5.2.5.1 Expression und Aufreinigung von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen	62
5.2.5.2 <i>In vitro</i> Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen	64
5.2.5.3 (Co-)Immunpräzipitation	65
5.2.5.4 Massenspektrometrischer Nachweis der Immunpräzipitate	66
5.2.6 Immunzytochemische Untersuchungen	68
5.2.6.1 Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie	68
5.2.6.2 Chromogene immunzytochemische Färbungen	68
5.2.7 Immunhistochemische Untersuchungen	70
5.2.7.1 Fixieren und Einbetten der Gewebe	70
5.2.7.2 Anfertigen von Gewebeschnitten	70
5.2.7.3 Chromogene immunhistochemische Färbungen	70
5.2.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	71
5.3 Reproduktionsbiologische Methoden	72
5.3.1 Isolierung von motilen epididymalen Nagerspermien und <i>in vitro</i> Kapazitation	72
5.3.2 Bestimmung des Hodengewichts, der Anzahl motiler Spermien und Beurteilung der Spermienmorphologie	72
5.3.3 Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion an Streptolysin-O permeabilisierten Spermien	73
5.3.3.1 Permeabilisierung mit SLO und Stimulation der Spermien	74
5.3.3.2 Coomassie-Färbung und Bestimmung des akrosomalen Status	75

5.3.4	Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion mit Hilfe des Calcium-Ionophors A23187.....	76
5.3.5	Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion durch Stimulation mit solubilisierter <i>Zona pellucida</i>	77
5.3.5.1	Präparation und Solubilisierung von <i>Zona pellucida</i>	77
5.3.5.2	Stimulation der Spermien mit <i>Zona pellucida</i>	78
5.4	Statistische Auswertung.....	79
5.5	Tierhaltung.....	79

6 Ergebnisse..... 81

6.1	Expression und Funktion der Gerüstproteine Bassoon und Piccolo/Aczonin in Nagerspermien.....	81
6.1.1	Immunzytochemischer Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in Mausspermien.....	81
6.1.2	Funktionelle Beteiligung von Bassoon und Piccolo/Aczonin an der Akrosomreaktion.....	83
6.1.3	Immunoblot-Analyse zum Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in isolierten Rattenspermien.....	89
6.2	Identifikation von Munc13-Subtypen im männlichen Reproduktionssystem von Nagern und ihre Bedeutung für die Akrosomreaktion.....	96
6.2.1	Immunoblot-Analysen zur Expression von Munc13 in männlichen Reproduktionsorganen und Spermien.....	96
6.2.2	Subzelluläre Lokalisation von Munc13 in Spermien.....	100
6.2.3	Assoziation von Munc13 an Detergens-unlösliche Membranmikrodomänen.....	103
6.2.4	Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der verschiedenen strukturellen Munc13-Domänen für die akrosomale Exozytose von Mausspermien.....	105
6.3	Bedeutung des <i>Rab3-interacting molecule</i> (RIM) für die Reproduktion von Nagern.....	109
6.3.1	Identifikation von RIM-Isoformen im männlichen Reproduktionssystem von Maus und Ratte.....	109
6.3.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RIM2 in Mausspermien.....	115
6.3.3	Assoziation der RIM2-Proteine an Detergens-resistente Membranmikrodomänen.....	117
6.3.4	Identifizierung von RIM2-Interaktionspartnern im Reproduktionsgewebe.....	120
6.3.4.1	<i>In vitro</i> Bindungsstudien von RIM2 und Munc13.....	121
6.3.4.2	Untersuchung der Interaktion von RIM2 und RIM-BP3.....	123
6.3.5	Funktionelle Bedeutung verschiedener struktureller RIM-Domänen für die Akrosomreaktion.....	125
6.3.6	Reproduktionsbiologische Charakterisierung eines RIM2 α -defizienten Mausmodells.....	128
6.3.6.1	Überprüfung der Gen-Defizienz und Lokalisation residualer RIM-Proteine im RIM2 α -defizienten Hodengewebe.....	128
6.3.6.2	Analyse von Reproduktions-relevanten anatomischen und morphologischen Parametern der RIM2 α -defizienten Mauslinie.....	132
6.3.6.3	Vergleich der spontanen Akrosomreaktionsrate von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien.....	134
6.3.6.4	Analyse der Calcium-Ionophor- und <i>Zona pellucida</i> -induzierten Akrosomreaktion von RIM2 α -defizienten Mausspermien.....	136

6.3.7	RIM2 als zentrales Bindeglied der akrosomalen Synapse	138
6.3.7.1	Massenspektrometrische Analysen zur Identifikation von weiteren testikulären RIM2-Bindungspartnern	138
6.4	Zusammenspiel von CaMKII und MUPP1 in Spermien.....	143
6.4.1	Funktion der CaMKII bei der Akrosomreaktion	143
6.4.1.1	Inhibition der spontanen Akrosomreaktion durch die CaMKII	143
6.4.1.2	Bestimmung des Aktivierungszustands der CaMKII in epididymalen Nagerspermien.....	146
6.4.2	Funktionelle Bedeutung eines CaMKII-MUPP1-Komplexes für die spontane Akrosomreaktion	150
6.4.2.1	Interaktion von CaMKII und MUPP1.....	150
6.4.2.2	Funktionelle Rolle der CaMKII-Interaktionsdomäne von MUPP1 für die spontane Akrosomreaktion	154
6.4.3	Weiterer Bindungspartner eines MUPP1-Komplexes	156
7	Diskussion.....	159
7.1	Die akrosomale Synapse in Spermien.....	159
7.1.1	Funktionelle Bedeutung eines RIM2-Munc13-Komplexes für das <i>priming</i> des akrosomalen Vesikels	161
7.1.2	Potentieller <i>docking</i> -Komplex aus Rab3 und RIM2.....	163
7.1.3	RIMs Funktion für die Rekrutierung von Calcium-Kanälen und damit für das <i>positional priming</i>	164
7.1.4	Das RIM2-Proteinnetzwerk: Potentielle Funktion weiterer identifizierter RIM-Interaktionspartner und Assoziationen zum Zytoskelett	165
7.1.5	Bedeutung eines MUPP1-CaMKII-Komplexes für die spontane Akrosomreaktion.....	168
7.1.6	<i>Membrane rafts</i> als Organisationsprinzip für die Akrosomreaktion.....	170
7.2	Das RIM2 α -defiziente Mausmodell: Funktionelle Bedeutung von RIM2 α für die Akrosomreaktion.....	171
7.3	Ausblick.....	173
8	Literaturverzeichnis	175
9	Anhang	187
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	187
9.2	Tabellenverzeichnis	189
9.3	Abkürzungsverzeichnis	190
9.4	Publikationsverzeichnis	194
9.4.1	Originalarbeiten.....	194
9.4.2	Übersichtsartikel	194
9.4.3	Tagungsbeiträge	194
9.5	Eidesstattliche Versicherung.....	196
9.6	Danksagung.....	197

1 Zusammenfassung

Für die erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle ist die Calcium-regulierte Akrosomreaktion des Spermiums eine essentielle Voraussetzung. Sie bewirkt nicht nur die seit langem bekannte Freisetzung hydrolytischer Enzyme aus dem akrosomalen Vesikel zur Penetration der Eihülle (*Zona pellucida*), sondern legt auch das für die Spermien-Oozyten-Erkennung notwendige Izumo-Protein auf der Spermienoberfläche frei. Erst durch die nach Eizellkontakt induzierte großflächige Verschmelzung von äußerer akrosomaler Membran und der darüber liegenden Plasmamembran an hunderten von Fusionsstellen wird genügend Izumo-Protein auf der inneren akrosomalen Membran exponiert, um eine stabile Verbindung mit dem kürzlich auf der Eizelloberfläche identifizierten Interaktionspartner Juno zu gewährleisten. Welche Regulationsmechanismen der Koordination dieser multiplen Einzelfusionsereignisse bei der Akrosomreaktion zugrunde liegen, ist bislang jedoch weitgehend ungeklärt. In Neuronen wird die Präzision der Calcium-regulierten Neurotransmitter-Exozytose durch die *cytomatrix of the active zone* (CAZ), einem Netzwerk aus SNARE-regulierenden Gerüstproteinen, koordiniert. Aufgrund der funktionellen Parallelen zwischen den Exozytoseprozessen in Neuronen und Spermien sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob in Spermien ein analoges, CAZ-ähnliches Proteinnetzwerk die sich Reißverschluss-artig ausbreitende, multiple Fusionsporenbildung der Akrosomreaktion kontrolliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das RIM2 α -Protein die Hauptisoform der RIM-Proteinfamilie in Säugerspermien darstellt, deren Vertreter seit einiger Zeit als molekulare Knotenpunkte des CAZ-Proteinnetzwerkes an der Präsynapse gelten. Neben RIM2 wurde auch für ubMunc13-2, das in dieser Arbeit als prädominanter Subtyp der Munc13-CAZ-Proteinfamilie in Spermien identifiziert wurde, sowie für die beiden riesigen Gerüstproteine Piccolo/Aczonin und Bassoon eine distinkte Lokalisation in der akrosomalen Region von Nagerspermien nachgewiesen. Des Weiteren konnte belegt werden, dass RIM2 und ubMunc13-2 an Detergens-resistente Membranmikrodomänen in Spermien assoziiert sind, die seit einiger Zeit für die Rekrutierung der SNARE-Fusionsmaschinerie in Spermien bekannt sind. Eine potentielle Netzwerk-bildende Funktion von RIM2 wurde in *in vitro* Bindungsstudien, die u. a. mit massenspektrometrischen Analysen kombiniert wurden, bestätigt. Dabei zeigte sich, dass RIM2 α sowohl testikuläres ubMunc13-2 als auch die CAZ-Proteine RIM-BP3 und das erstmals in Reproduktionsgewebe nachgewiesene ELKS/ERC2 sowie

einige Zytoskelett-assoziierte Proteine bindet. Die funktionelle Bedeutung eines CAZ-ähnlichen Netzwerkes für die Akrosomreaktion wurde in quantitativen Exozytose-Analysen an epididymalen Spermien verifiziert. Eine selektive Blockierung einzelner Domänen von RIM2, aber auch von ubMunc13-2 und Piccolo/Acsonin reduzierte die Calcium-induzierte akrosomale Exozytoserate um mindestens 45 %. Die Funktion der α -Isoform des RIM2-Proteins konnte durch funktionelle Exozytosestudien an RIM2 α -defizienten Spermien einer entsprechenden Gen-defizienten Mauslinie verifiziert werden. Interessanterweise führte eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch das Calcium-Ionophor A23187 zu keinem signifikanten Unterschied der Akrosomreaktion von RIM2 α -defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Spermien. Dieser Befund könnte möglicherweise auf eine kompensatorische Wirkung anderer, ebenfalls in Spermien exprimierter RIM1- und RIM2-Isoformen zurückzuführen sein. Allerdings wurde für die Akrosomreaktion nach Stimulation mit isolierter und solublisierter *Zona pellucida* in RIM2 α -defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Spermien eine signifikante Reduzierung der akrosomalen Exozytose-Induktion festgestellt. Da die Applikation eines Calcium-Ionophors die Signalkaskade umgeht, die unter physiologischen Bedingungen zum Calcium-Influx und damit zur Membranfusion führt, scheint das RIM2 α -Protein Komponenten der Signalkaskade und/oder die Calcium-Kanäle für die Akrosomreaktion zu rekrutieren. Somit könnte es dazu beitragen die gerichtete, großflächige Fusionsporenbildung nach *Zona pellucida*-Stimulation zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Untersuchungen deuten außerdem an, dass RIM2 α eine Interaktion mit dem Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (MUPP1) eingehen könnte. MUPP1 ist im Komplex mit der Calcium/Calmodulin abhängigen Kinase II daran beteiligt, eine spontane, durch die sekundäre Reifung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt begünstigte Akrosomreaktion zu verhindern. Als molekularer Knotenpunkt könnte RIM2 demnach sowohl eine spontane Exozytose verhindern als auch durch die Rekrutierung weiterer CAZ-Proteine und des Zytoskeletts die großflächige, multiple Fusionsporenbildung zur Freilegung von ausreichend Izumo-Molekülen auf der Spermienoberfläche sicherstellen. Eine Lokalisation in Detergens-resistenten Membranplattformen, wie sie auch für MUPP1 und die SNARE-Proteine in Spermien gezeigt wurde, könnte diese integrierende Funktion von RIM2 für die akrosomale Exozytose unterstützen.

2 Summary

The acrosome reaction has two key functions that ensure successful fertilization. Firstly, the release of hydrolyzing enzymes from the acrosomal vesicle is necessary for the sperm to penetrate the egg's glycoprotein matrix, the *zona pellucida*. Secondly, the exposure of the oocyte recognition protein Izumo on the sperm's surface is important for the final fusion with the oocyte. Upon oocyte contact, an extensive merge of the outer acrosomal membrane and the overlaying plasma membrane at hundreds of distinct fusion sites is induced and serves to uncover sufficient Izumo-protein for stable pairing of Izumo and the recently identified oocyte counterpart Juno. To date, the regulatory mechanism(s) that coordinate(s) this multipoint membrane fusion during acrosome reaction are poorly understood. In neuronal presynaptic termini, precision of vesicle fusion is coordinated by components of the cytomatrix of the active zone (CAZ) - a network of SNARE-regulating scaffold proteins. Due to the functional parallels between exocytosis in neurons and sperm, the aim of the present work was to investigate if an analogous CAZ-like protein network controls the zipper-like propagation of multipoint membrane fusion during acrosome reaction in sperm.

Of the RIM-family of CAZ-proteins which recently have been shown to be central coordinators of the neuronal CAZ-network, the RIM2 α -protein was found to be the predominant sperm isoform. A distinct localization in the acrosomal region of rodent sperm was observed for RIM2 and ubMunc13-2, which was identified as the major sperm isoform of the Munc13 CAZ-protein family, as well as the giant scaffold proteins Piccolo/Aczonin and Bassoon. Moreover, RIM2 and ubMunc13-2 were found to be associated to detergent-resistant membrane micro domains known to cluster the SNARE fusion machinery in sperm. A potential networking function of RIM2 was addressed in *in vitro* interaction studies combined with tandem mass spectrometry analyses. Thereby, the CAZ-proteins ubMunc13-2, RIM-BP3 and ELKS2/ERC2, which was identified for the first time in reproductive tissue, as well as several cytoskeleton-associated proteins were found to be testicular binding partners of RIM2. The functional role of a potential CAZ-like protein network during acrosomal exocytosis was verified in quantitative exocytosis studies using epididymal sperm. The selective block of distinct binding modules of either RIM, Munc13 or Piccolo/Aczonin resulted in a significant reduction of calcium-induced acrosomal exocytosis of at least 45 %. The functional significance of the α -isoform of RIM2-proteins was further examined in

functional exocytosis experiments using RIM2 α -deficient sperm of a gene-deficient mouse line. Interestingly, following an increase of the intracellular calcium concentration byway of the addition of the calcium ionophor A23187, only a slight difference in acrosomal exocytosis between wild-type and RIM2 α -deficient spermatozoa was observed. This might be due to compensatory effects of other RIM1- and RIM2-isoforms expressed in sperm. In contrast, potentiation of acrosome reaction rates determined upon stimulation with isolated, solubilized *zona pellucida* was found to be significantly reduced in RIM2 α -deficient compared to wild-type sperm. Because the application of a calcium ionophor bypasses *zona pellucida*-induced signaling, leading to calcium influx and membrane fusion, the results indicate that RIM2 α in spermatozoa recruits components of the signal transduction pathway and/or calcium channels to ensure the extensive, directed multipoint membrane fusion observed with *zona pellucida* stimulation.

Besides this coordination of membrane fusion, the present work also provides evidence for RIM2 as part of a complex consisting of the multi PDZ domain protein 1 (MUPP1) and the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. This complex has been shown to be important for arresting spontaneous acrosomal exocytosis occurring as a result of secondary sperm maturation in the female reproductive tract. Therefore, RIM2 might represent the molecular backbone for preventing spontaneous exocytosis as well as recruiting additional CAZ-proteins and cytoskeletal proteins for successful membrane fusion, ensuring the exposure of sufficient Izumo molecules on the sperm surface. RIM2's localization in detergent-resistant membrane platforms, which has also been observed for MUPP1 and SNARE-proteins in sperm, could support an integrating function of RIM2 for acrosomal exocytosis.

3 Einleitung

3.1 Das Spermatozoon

3.1.1 Aufgaben eines Spermiums

Die zentrale Aufgabe von Spermien und Oozyten ist es, ihre haploiden Genome zu vereinigen, sodass die genetische Diversität einer sich sexuell reproduzierenden Spezies sichergestellt wird. Die Spermienzelle muss dafür nach der Ejakulation jedoch eine Vielzahl von Prozessen durchlaufen, durch die sie sowohl die Fähigkeit als auch die Möglichkeit zur Befruchtung einer Eizelle erlangt (zur Übersicht s. Buffone, Ijiri et al. 2012). Für Säugerspermien gehört dazu als erstes die aktive und gezielte Fortbewegung durch den Uterus bis hin zum Eingang des Ovidukts, in dessen distalem Abschnitt sich die Oocyte befindet (Abbildung 3.1). Im proximalen Segment des Eileiters, dem Isthmus (Abbildung 3.1), angekommen, durchläuft ein Spermium aber zunächst einen aus vielen Einzelprozessen bestehenden, komplexen, sekundären Reifungsprozess. Diese sogenannte Kapazitation schafft die Voraussetzungen für die anschließenden Aufgaben des Spermiums (Austin 1952). Chemotaktische und thermotaktische Wegfindungsmechanismen ermöglichen es dem Spermium, die Oocyte in der Ampulla des Ovidukts zu finden (Eisenbach und Giojalas 2006). Die Exozytose hydrolytischer Enzyme und hyperaktive Bewegungsimpulse des Spermiums fördern anschließend die Penetration der männlichen Keimzelle durch die äußere Granulosazellschicht der Eizelle, den sogenannten Eihügel (*Cumulus oophorus*), und ermöglichen das Durchdringen der Glykoproteinhülle (*Zona pellucida*) (Abbildung 3.1). Nur so kann das Spermium überhaupt zur Plasmamembran der Oocyte gelangen und die Eizelle letztendlich befruchten (Salicioni, Platt et al. 2007; Abbildung 3.1). In den folgenden Abschnitten werden daher die bisher bekannten morphologischen, physiologischen und molekularen Grundlagen beschrieben, die es dem Spermium ermöglichen, diese sehr unterschiedlichen Anforderungen für eine erfolgreiche Befruchtung zu erfüllen.

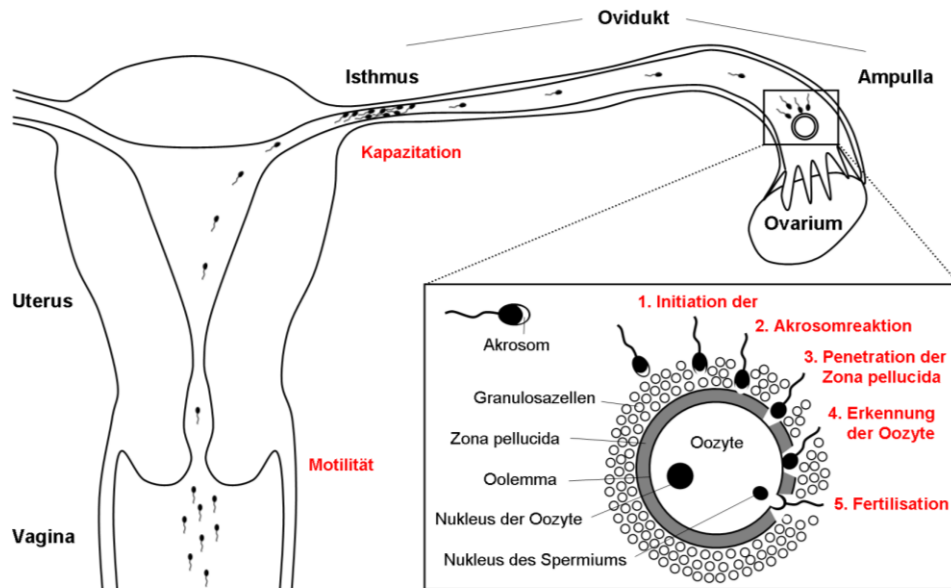


Abbildung 3.1: Zuordnung der diversen Spermienfunktionen zu den einzelnen Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes.

Nach der Ejakulation der Spermien in die Vagina schwimmen diese durch den Uterus und den Ovidukt in Richtung der Ampulla des Eileiters [Motilität], wo sich die Oozyte nach der Ovulation befindet. Im proximalen Segment des Oviduktes [Isthmus] unterbrechen die Spermien allerdings ihre „Wanderung“ und durchlaufen zuerst einen sekundären Reifungsprozess [Kapazitation], bevor sie ihren Weg zur Oozyte fortsetzen. Nach dem Erreichen der Oozyte müssen die kapazitierten Spermien zunächst den aus Granulosazellen und extrazellulärer Matrix bestehenden Cumulus oophorus und die Eizelhülle [Zona pellucida] durchdringen, um überhaupt zur Eizellmembran [Oolemma] zu gelangen. Während der Passage des Cumulus oophorus wird die Akrosomreaktion initiiert [1.], wodurch der Inhalt des Akrosoms ausgeschüttet wird [2.], sodass das Spermium die Zona pellucida penetrieren kann [3.]. Gleichzeitig werden die für die Erkennung der Eizelle [4.] notwendigen Moleküle freigelegt, die sich zuvor im Inneren des Akrosoms befanden. Nach der erfolgreichen Bindung des Spermiums an das Oolemma [4.] findet die eigentliche Fusion der beiden Keimzellen statt, wodurch die Zygote gebildet wird [5.]. Anatomische und morphologische Details sind in schwarz, die Aufgaben der Spermien in rot beschriftet.

3.1.2 Morphologie eines Spermiums

Der funktionellen Spezialisierung der Spermien liegt eine strikte morphologische Kompartimentierung zugrunde (Zitranski, Borth et al. 2010; Abbildung 3.2), bei der die beiden Hauptkompartimente – das Flagellum und der Kopf – jeweils ganz unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Das Flagellum ermöglicht die aktive Fortbewegung des Spermiums. Folglich kann ein Säugerspermium die verhältnismäßig lange Wegstrecke (mehr als das 1000-fache seiner Gesamtlänge; Eisenbach und Turkaspa 1999; Suarez und Pacey 2006) von der Vagina durch den Uterus bis hin zur Eizelle in der Ampulla des Ovidukts überwinden (Abbildung 3.1). Dazu ist das Flagellum morphologisch in drei Segmente unterteilt: Das Mittel-, Haupt- und Endstück (Abbildung 3.2). Alle drei Abschnitte sind vom Axonem durchzogen, das aus der für Mikrotubuli typischen (9 + 2)-Struktur aufgebaut ist und das die geißelartige Bewegung des Flagellums ermöglicht (Inaba 2003). Im Mittelstück sind zudem eine Vielzahl von Mitochondrien Manschetten-artig um das Axonem angeordnet, die die nötige Energie für die Fortbewegung bereitstellen (Darszon, Nishigaki et al. 2011). Außerdem werden auf der Oberfläche des Flagellums die notwendigen Erkennungsmoleküle für die

Wahrnehmung thermotaktischer und chemotaktischer Signale vermutet, die für die Auffindung der Oozyte in der Ampulla essentiell sind (Eisenbach und Giojalas 2006; Bahat, Caplan et al. 2012; Brenker, Goodwin et al. 2012).

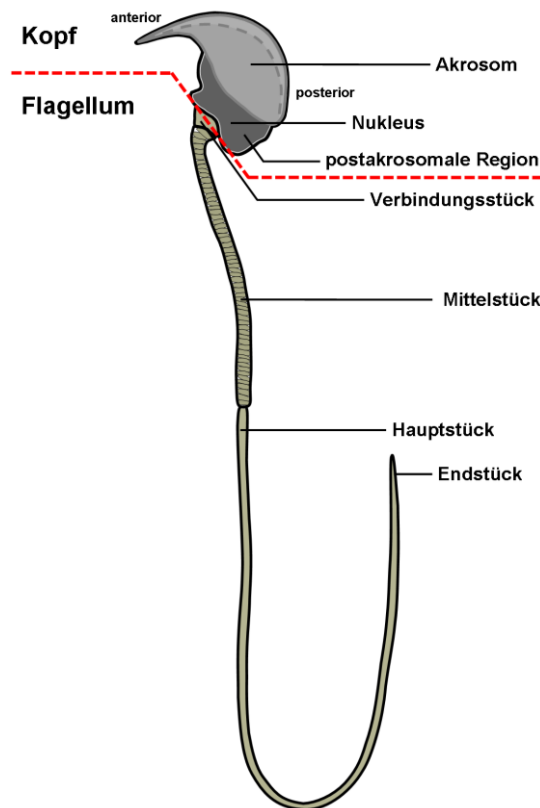


Abbildung 3.2: Morphologie eines Mausspermiums.

Die schematische Darstellung zeigt die zwei Hauptkompartimente eines Spermiums – den Kopf und das Flagellum (durch die gestrichelte rote Linie abgegrenzt). Das Flagellum wird in Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt und ist für die Fortbewegung der Spermienzelle verantwortlich. Im Kopf befinden sich der Nukleus mit dem kondensierten, haploiden Chromosomensatz und das in Mausspermien in der Aufsicht halbmondförmig erscheinende, mit hydrolytischen Enzymen gefüllte akrosomale Vesikel. Abbildung aus Zitranski, Borth et al. 2010.

Der Kopf eines Spermiums (Abbildung 3.2) enthält neben dem Nukleus mit dem zu transferierenden stark kondensierten haploiden Chromosomensatz das akrosomale Vesikel (Zitranski, Borth et al. 2010), das von der darüber liegenden Plasmamembran nur durch einen sehr schmalen zytoplasmatischen Bereich separiert ist. Dieses im Verhältnis zu synaptischen Vesikeln (Sudhof 2004; Wilhelm, Mandad et al. 2014) riesige akrosomale Vesikel (Burgess und Kelly 1987) entsteht während der Spermiogenese durch die Fusion einer Vielzahl von Golgi-Vesikeln (Kierszenbaum, Rivkin et al. 2007). Es sitzt dem Nukleus kappenartig auf und nimmt fast den gesamten anterioren Bereich des Spermienkopfes zwischen Nukleus und Plasmamembran ein (Abbildung 3.2). Diese enorme Größe des Akrosoms spiegelt sich auch in dessen Bedeutung für eine erfolgreiche Befruchtung der Oozyte wieder. Die im Inneren des akrosomalen Vesikels stark konzentrierten Hydrolasen (Akrosin, Esterasen, Hyaluronidasen, saure Proteinase; Tulsiani, Abou-Haila et al. 1998) können die *Zona pellucida* verdauen (Nakano, Tanaka et al. 1989; Tulsiani, Abou-Haila et al.

1998), die bei Säugern aus einem stark vernetzten Glykoprotein-Geflecht besteht (Gupta, Bhandari et al. 2012). Gleichzeitig wird bei der Akrosomreaktion genannten Enzymsekretion durch die fast vollständige Fusion des Akrosoms (s. Abschnitt 3.1.4) sichergestellt, dass sowohl das Innere des Vesikels – die für die Bindung des Spermiums an die *Zona pellucida* wichtige akrosomale Matrix (Tranter, Read et al. 2000; Buffone, Hirohashi et al. 2014) – als auch die für die Eizellerkennung essentielle akrosomale Membran freigelegt werden (Bianchi, Doe et al. 2014). Da die physiologischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Akrosomreaktion bereits während der Kapazitation der Spermien im weiblichen Genitaltrakt geschaffen werden (Salicioni, Platt et al. 2007), wird dieser funktionelle Reifungsprozess im Folgenden detaillierter beschrieben.

3.1.3 Die Kapazitation

Während dieses posttestikulären Reifungsprozesses sind die Spermien *in vivo* am Epithel des proximalen Segments des Ovidukts, dem Isthmus, angeheftet (Hung und Suarez 2010; Abbildung 3.1). Während dieser Arretierung erfahren die Spermien eine Vielzahl von Modifikationen, die insgesamt zu Aktivitätsveränderungen einer Reihe von Enzymen (Jha, Kameshwari et al. 2003), zu einer Umbildung der Komposition der Zellmembranen (Flesch, Brouwers et al. 2001) sowie zu einer Hyperaktivierung der Spermienmotilität führen (Kirichok, Navarro et al. 2006). Da reife Spermien über keinen aktiven Transkriptions- sowie Translationsapparat verfügen (Rahman, Lee et al. 2013), kommt die Neusynthese von Proteinen als Regulationsprinzip physiologischer Prozesse nicht in Betracht (Darszon, Nishigaki et al. 2011). Folglich können die für die Kapazitation der Spermien notwendigen Veränderungen nur über posttranslationale Modifikationen bereits exprimierter Proteine erfolgen. Dabei hat sich in den vergangenen Jahren gezeigt, dass den *second messenger*-medierten Proteinphosphorylierungen eine besondere Rolle zukommt (Ickowicz, Finkelstein et al. 2012). Daneben scheint die Aktivität von Proteinen aber auch durch Veränderungen in der Ionenkomposition der Keimzelle und/oder des Membranpotentials vermittelt zu werden (Santi, Martinez-Lopez et al. 2010; Lopez-Gonzalez, Torres-Rodriguez et al. 2014). Obwohl einzelne Details der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Kapazitation bisher nicht völlig aufgeklärt werden konnten (Rahman, Kwon et al. 2014), wird gegenwärtig angenommen, dass die veränderte Spermienphysiologie auf molekularer Ebene im Wesentlichen durch folgende Signale bzw. intrazelluläre Botenstoffe vermittelt wird: Eine Erhöhung des zytoplasmatischen zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels (Xie, Garcia et al. 2006; Visconti 2009), einen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes (Florman, Tombes et al. 1989) sowie einen Einstrom von Calcium-Ionen in das Zytoplasma der Spermienzelle (Lopez-Gonzalez, Torres-Rodriguez et al. 2014; Rahman, Kwon et al. 2014). Die Erhöhung der

intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt dabei durch die Aktivierung einer speziellen, löslichen Adenylatzyklase (*soluble adenylate cyclase*, sAC) (Chen, Cann et al. 2000), dessen Deletion zu Sterilität führt (Xie, Garcia et al. 2006). Die sAC wird nicht, wie die Membran-ständigen Adenylatzyklasen, durch G-Proteine reguliert, sondern durch Bicarbonat (HCO_3^-) und Calcium direkt aktiviert (Buck, Sinclair et al. 1999; Chen, Cann et al. 2000; Visconti 2009). Die Bicarbonat- und Calcium-Konzentrationen sind im Milieu des männlichen Spermien-Speicherorgans, des Nebenhodens, verhältnismäßig gering (Rodriguez-Martinez, Ekstedt et al. 1990). Da sie im Seminalplasma und im weiblichen Genitaltrakt jedoch wesentlich höher sind (Visconti 2009), kommt es erst nach der Ejakulation der Spermien zur Aktivierung der sAC und damit zur Zyklisierung des Adenosintriphosphats (ATP) zu cAMP (Visconti 2009). Die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Keimzelle führt daraufhin zur Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Visconti 2009), die ihrerseits eine Reihe von Tyrosinkinasen aktiviert, die für die beobachteten umfangreichen Phosphorylierungen von Spermienproteinen verantwortlich sind (Jha, Kameshwari et al. 2003). Diese Tyrosinphosphorylierungen werden vor allem mit der hyperaktiven Spermienmotilität assoziiert (Luconi, Forti et al. 2006; Mannowetz, Wandernoth et al. 2012), die durch eine Peitschenschlag-artige Flagellumrotation charakterisiert ist (Suarez 2008). Außerdem kommt es PKA-abhängig zu einer Umverteilung von Membranlipiden und damit zu einer Erhöhung der Membranfluidität, dem sogenannten *phospholipid scrambling* (Gadella und Harrison 2002). Das *phospholipid scrambling* ermöglicht die für die Kapazitation charakteristische Auslagerung von Cholesterol aus der Plasmamembran der Spermien (Flesch, Brouwers et al. 2001).

Die durch vermehrten Bicarbonat-Transport ausgelöste Alkalisierung des Spermienzytoplasmas (Liu, Wang et al. 2012) hingegen erhöht die Leitfähigkeit eines pH-sensitiven und Spermien-spezifischen Kalium-Kanals der Slo- (*slowpoke*)-Familie (Chan, Wu et al. 1998). Dadurch kommt es zur typischen Hyperpolarisation der Plasmamembran kapazitierter Spermien (Santi, Martinez-Lopez et al. 2010; Brenker, Zhou et al. 2014). Neben der Aktivierung des Slo-Kanals führt der Anstieg des intrazellulären pH-Wertes auch zur Aktivierung von Vertretern der Calcium-selektiven Kanäle der CatSper (*cationic channel of sperm*)-Familie, einer Gruppe von vier nahe verwandten, Spermien-spezifischen Calcium-Kanälen (Kirichok, Navarro et al. 2006; Ren und Xia 2010), deren Deletion zur Infertilität führt (Ren, Navarro et al. 2001; Ren und Xia 2010). Der CatSper-vermittelte Einstrom von Calcium-Ionen in die Spermienzelle trägt ebenfalls zum hyperaktiven Bewegungsmuster bei (Kirichok, Navarro et al. 2006). Diese Hyperaktivierung dient den Spermien dazu, sich nach der Kapazitation vom Isthmus des Eileiters zu lösen (Suarez 2008), sich besonders effektiv im Mucus-gefüllten Ovidukt in Richtung Oozyte fortzubewegen (Sobrero und Macleod 1962) und durch den *Cumulus oophorus* und die *Zona pellucida* zur Plasmamembran der Eizelle vorzudringen (Suarez und Pacey 2006).

3.1.4 Die Akrosomreaktion

Neben diesem mechanischen Antrieb zur Penetration des *Cumulus oophorus* und der *Zona pellucida* ist vor allem die Akrosomreaktion eine essentielle Voraussetzung dafür, dass die Spermien die Plasmamembran der Oozyte, das *Oolemma*, erreichen und letztendlich mit dieser zur Zygote verschmelzen können (Sutovsky 2009; Yanagimachi 2011; Sebkova, Ded et al. 2014). Die Akrosomreaktion ist ein Exozytoseprozess, der beim Aufeinandertreffen von Spermium und Eizellkomplex (Abbildung 3.1) initiiert wird (Jin, Fujiwara et al. 2011). Dabei fusioniert das akrosomale Vesikel fast vollständig mit der darüber liegenden Plasmamembran, sodass dessen enzymatischer Inhalt freigesetzt und gleichzeitig die innere Matrix freigelegt wird (Kierszenbaum 2000).

Abbildung 3.3 veranschaulicht, dass das Akrosom in Richtung Nukleus von der inneren akrosomalen Membran begrenzt wird. Zur Plasmamembran hin wird die räumliche Abgrenzung von Akrosom und Zytosol durch die äußere akrosomale Membran gewährleistet. Während der Akrosomreaktion fusioniert die äußere akrosomale Membran mit der darüber liegenden Plasmamembran (Kierszenbaum 2000). Aufgrund der im Vergleich zu synaptischen Vesikeln (Sudhof 2004) enormen Größe des akrosomalen Vesikels (Burgess und Kelly 1987) verschmelzen die beiden Membranen nicht nur an einer einzelnen Kontaktstelle, sondern an hunderten von einzelnen Loci (Barros, Bedford et al. 1967; Florman, Jungnickel et al. 2008). Dabei bilden sich aus äußerer akrosomaler Membran und der darüber liegenden Plasmamembran zusammengesetzte Pseudovesikel (*mixed vesicles*, MVs; Tsai, Brewis et al. 2012), in deren Innerem Zytoplasma eingeschnürt wird (Abbildung 3.3). Diese Art der Fusion führt zu einer großflächigen Ablösung der beiden Membranen, die insgesamt mehr als die Hälfte der Kopfoberfläche des Spermiums freilegt (Zanetti und Mayorga 2009; Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). Durch diesen Fusionsmechanismus wird gewährleistet, dass eine ausreichend hohe lokale Konzentration der gespeicherten akrosomalen Enzyme freigesetzt wird. Die *Zona pellucida* besteht je nach Säugerspezies aus drei bzw. vier Glykoproteinen (ZP1-4), die zusammen ein stark polymerisiertes Netzwerk bilden (Gupta, Bhandari et al. 2012), das von den sekretierten akrosomalen Enzymen hydrolysiert werden kann (Nakano, Tanaka et al. 1989; Tulsiani, Abou-Haila et al. 1998). Folglich ist das Spermium mit Hilfe der Akrosomreaktion in der Lage, diese Schutzhülle der Eizelle zu durchdringen (Tranter, Read et al. 2000).

Vor allem aber wird durch die großflächige Ablösung von äußerer akrosomaler Membran und Plasmamembran die auf der nukleären Seite des Akrosoms lokalisierte innere akrosomale Membran als neue Plasmamembran etabliert (Abbildung 3.3; Austin 1963; Barros, Bedford et al. 1967). Dabei haben jüngste Studien gezeigt, dass das in dieser „neuen“ Plasmamembran lokalisierte Membranprotein Izumo (in Anlehnung an einen japanischen Hochzeitsschrein) für die befruchtende Fusion mit der Eizelle essentiell ist (Vjugina und Evans 2008; Tanihara, Nakai et al. 2014). Jedoch blieb das

entsprechende Gegenstück auf der Eizellmembran, der Izumo-Rezeptor, aufgrund der vermuteten geringen Affinität zu Izumo (Bianchi, Doe et al. 2014) lange unbekannt. Erst in jüngsten Studien konnte der Izumo-Rezeptor als das Protein Juno identifiziert werden, das nach der römischen Göttin der Geburt, Ehe und Fürsorge benannt wurde (Bianchi, Doe et al. 2014). Sowohl die Deletion von Juno als auch die von Izumo verhindert die Fusion von Oozyte und Spermium – daher sind entsprechende Gen-defiziente Mäuse steril (Bianchi, Doe et al. 2014). Da die innere akrosomale Membran, in der Izumo lokalisiert ist, erst durch die Akrosomreaktion freigelegt wird, ist dieser Exozytoseprozess eine essentielle Voraussetzung für die Entstehung einer Zygote (Sebkova, Ded et al. 2014). Bemerkenswert ist zudem, dass die außerordentlich geringe Affinität der Bindung von Juno und Izumo vermutlich die Bildung multipler Juno-Izumo-Interaktionen zur Erhöhung der Avidität der Bindung für eine erfolgreiche Fertilisation erfordert (Bianchi, Doe et al. 2014). Dabei ist anzunehmen, dass eine vollständige Akrosomreaktion für die Offenlegung eines genügend großen Bereiches der inneren akrosomalen Membran notwendig ist, damit eine ausreichende Menge an Izumo-Protein für die Bindung an Juno bei der Befruchtung zur Verfügung steht.

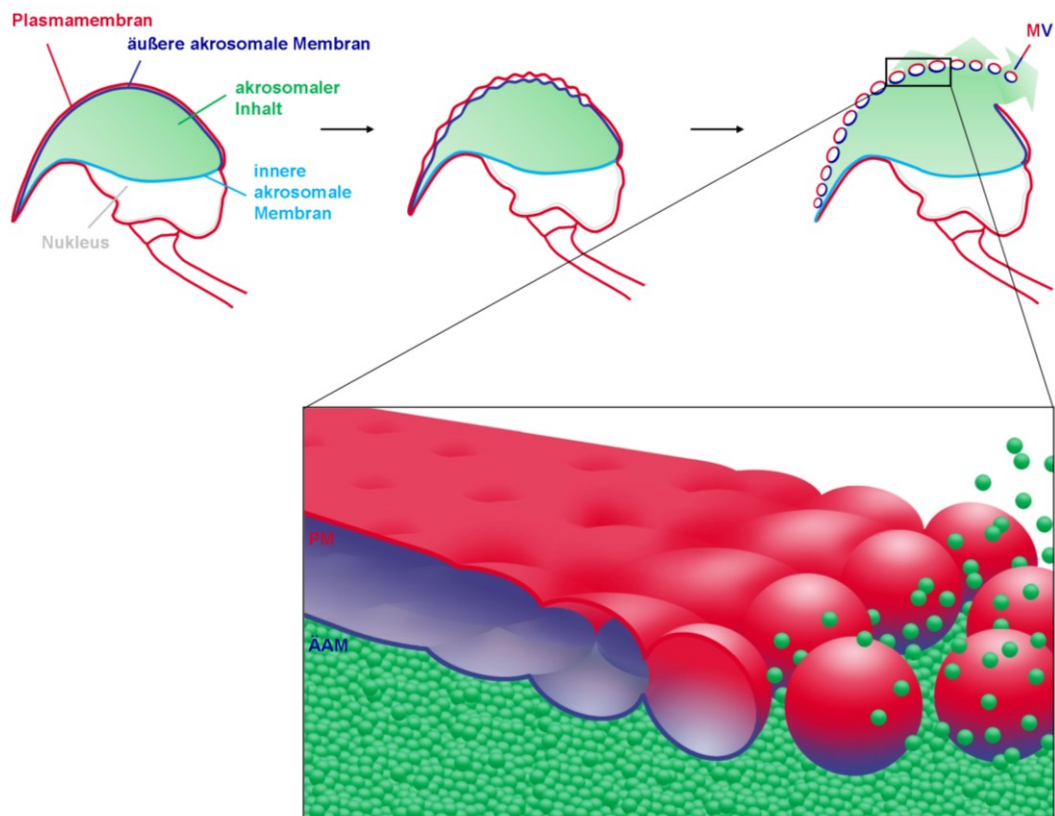


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Pseudovesikelbildung während der Akrosomreaktion.

Das akrosomale Vesikel wird zur Plasmamembran hin von der äußeren akrosomalen Membran, in Richtung Nukleus von der inneren akrosomalen Membran begrenzt und sitzt dem Zellkern kappenartig auf. Bei der Akrosomreaktion fusioniert die äußere akrosomale Membran (AAM) an vielen hundert Kontaktstellen mit der Plasmamembran (PM), sodass gemischte Pseudovesikel (MV) entstehen, die eine großflächige Ablösung der beiden Membranen realisieren. Die Freisetzung (grüne Pfeile in der Übersicht) der akrosomalen Enzyme (grüne Kugeln in der vergrößerten Darstellung) beginnt im posterioren akrosomalen Bereich und schreitet zur anterioren Spitze des Akrosoms fort. Nach der Akrosomreaktion bleibt die innere akrosomale Membran als neue Plasmamembran zurück, gleichzeitig wird der gesamte Inhalt des Akrosoms freigesetzt. Die Beschriftung erfolgte jeweils in der Farbe der Symbole.

Die Bildung von hunderten von Pseudovesikeln läuft während der Akrosomreaktion offenbar nicht nach dem Zufallsprinzip ab, sondern folgt einem festgelegten, räumlichen Muster, das dem Aufziehen eines Reißverschlusses ähnelt und in *live cell imaging* Studien eindrucksvoll bestätigt werden konnte. Dafür wurden transgene Mausspermien verwendet, die unter der Promotoraktivität von Proakrosin, dem Propetid des akrosomalen Enzyms Akrosin, das Fluoreszenzprotein GFP (*green fluorescent protein*) im Akrosom exprimieren (Nakanishi, Ikawa et al. 1999). Mikroskopische Videoanalysen dieser Spermien mit grün fluoreszierendem Akrosom haben gezeigt, dass der Verlust des akrosomalen Fluoreszenzsignals während der durch einen physiologischen Stimulus (solubilisierter *Zona pellucida*) hervorgerufenen Akrosomreaktion immer gerichtet vom posterioren zum anterioren akrosomalen Bereich des Spermienkopfes verläuft (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009; Abbildung 3.3). Im Gegensatz dazu führte eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch ein Calcium-Ionophor zu einer zufällig verteilten Pseudovesikelbildung (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009).

Die Akrosomreaktion ist ein essentieller Prozess für die Befruchtung und damit für den Fortbestand einer Spezies. Trotzdem sind bisher nicht alle Details der beteiligten Signalkaskaden und deren Regulation bekannt. Der nachfolgende Abschnitt fasst daher das Zusammenspiel der Signalmoleküle zusammen, die gegenwärtig als Auslöser für die Akrosomreaktion diskutiert werden (Abbildung 3.4). Lange wurde angenommen, dass die Bindung der Spermien an die *Zona pellucida* den entscheidenden Stimulus für die Akrosomreaktion darstellt (Florman und Storey 1982). Für die *in vitro* durchgeführten Studien, die dieser Interpretation zugrunde liegen, wurden jedoch größtenteils Oozyten verwendet, deren *Cumulus oophorus* zuvor präparativ entfernt worden war (Gadella 2012). Erst mit Hilfe der oben beschriebenen transgenen Mausspermien, die GFP in ihrem Akrosom exprimieren, ist es in jüngster Zeit möglich geworden, die Freisetzung des akrosomalen Inhalts in Echtzeit-Analysen zu verfolgen. Dabei wurden Eizellen verwendet, deren *Cumulus oophorus* zuvor nicht entfernt wurde. Bei der Analyse der Fluoreszenzfreisetzung konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Exozytose von GFP aus dem Akrosom und damit der Beginn der Akrosomreaktion bereits während der Passage der Spermien durch den *Cumulus oophorus* beginnt (Jin, Fujiwara et al. 2011; s. vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 3.1). Genauso wie die Oozyte sind die *Cumulus*-Zellen ebenfalls in eine Matrix eingebettet, die im Gegensatz zur *Zona pellucida* nicht aus Glykoproteinen, sondern aus Hyaluronsäure-Polymeren besteht (Yanagimachi 2011). Ob die *Cumulus*-Zellen selbst und/oder ob Bestandteile der *Cumulus*-Matrix für die Initiation der Akrosomreaktion verantwortlich sind, ist bislang jedoch nicht geprüft worden (Jin, Fujiwara et al. 2011; Chiu, Lam et al. 2014). Da aber auch *Cumulus*-freie Oozyten befruchtet werden können (Florman und Storey 1982; Yanagimachi 2011) und die *Zona pellucida* ebenfalls die Akrosomreaktion auslösen kann (Buffone, Rodriguez-Miranda et

al. 2009), ist nicht abschließend geklärt, ob die gesamte Akrosomreaktion bereits im *Cumulus oophorus* abläuft oder nur dort initiiert und anschließend an/in der *Zona pellucida* beendet wird (Jin, Fujiwara et al. 2011; Gadella 2012; s. vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 3.1). Erschwert wird eine eindeutige Zuordnung des Stimulus für die Akrosomreaktion dadurch, dass die Erkennungsmoleküle der Spermien, die die Bestandteile des *Cumulus oophorus* und/oder der *Zona pellucida* tatsächlich *in vivo* erkennen, bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten (Gadella 2012; Chiu, Lam et al. 2014). Als Kandidaten werden derzeit sowohl verschiedene Spermien-spezifische und Polysaccharid-bindende Moleküle (z. B. Zonadhesin, sp56, β -1,4-Galaktosyltransferase, β -Mannosidase; Sinowatz, Plendl et al. 1998; Nixon, Aitken et al. 2007; Chiu, Lam et al. 2014) als auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR; Florman, Jungnickel et al. 2008) diskutiert, da der Nachweis der Pertussistoxin-Sensitivität der Akrosomreaktion auf die Aktivierung eines $G_{i/o}$ -Proteins schließen lässt (Arnoult, Zeng et al. 1996). Studien an entsprechenden Gen-defizienten Mausmodellen zur Überprüfung der These, dass einzelne dieser Moleküle die Akrosomreaktion initiieren, haben allerdings gezeigt, dass die genetische Deletion einzelner Kandidaten keine vollständige Sterilität der Männchen zur Folge hatte (Okabe und Cummins 2007). Plausibel und mit den bisherigen Beobachtungen kompatibel wäre daher ein Modell, bei dem die Interaktion von Spermium und Oozytenkomplex mehrere, möglicherweise aufeinanderfolgende und/oder in ihrer Auswirkung redundante Erkennungssignale aus *Cumulus oophorus* und *Zona pellucida* umfasst (van Gestel, Brewis et al. 2007; Chiu, Lam et al. 2014).

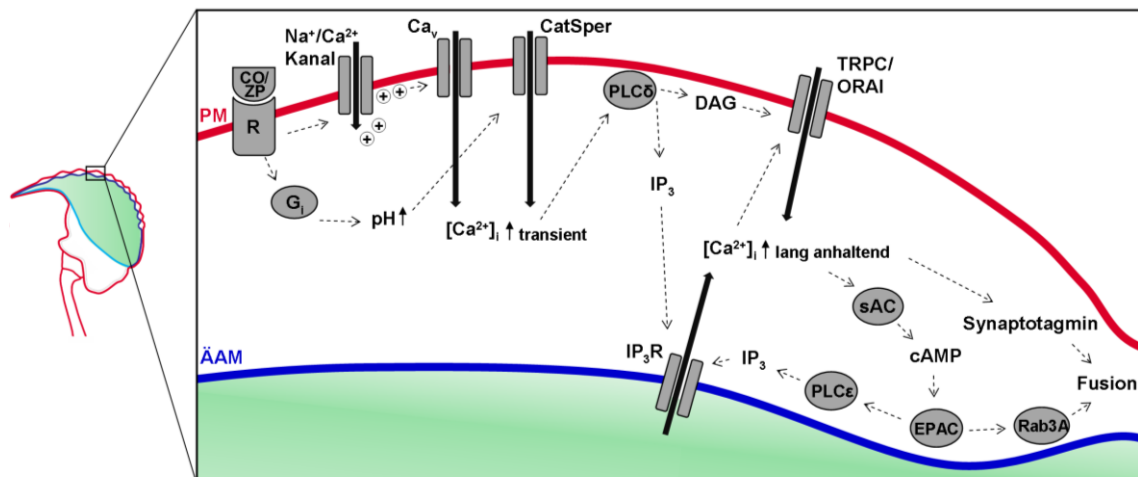


Abbildung 3.4: Signaltransduktionsprozesse während der Akrosomreaktion.

Die Bindung des Spermiums an den *Cumulus oophorus* (CO) und/oder die *Zona pellucida* (ZP) durch einen oder mehrere bisher nicht identifizierte Rezeptoren (R) initiiert diverse, teils parallel, teils sequentiell ablaufende Signaltransduktionskaskaden, die insgesamt eine transiente und darauf folgende lang anhaltende Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bewirken. Das durch die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ aktivierte Synaptotagmin kann dann die Fusion der äußeren akrosomalen Membran (ÄAM) mit der Plasmamembran (PM) bewirken. Für eine genaue Beschreibung des Ablaufs s. Text.

Im Gegensatz zur ungeklärten Identität des potentiellen, die Akrosomreaktion auslösenden Rezeptors sind die molekularen Vorgänge der Exozytose des Akrosoms zwar nicht vollständig, aber besser verstanden. Dabei hat sich in den vergangenen Jahren gezeigt, dass die Vesikelfusion, analog zur Vesikelfusion in anderen zellulären Systemen (Jahn 2004), durch eine Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration ausgelöst wird (Breitbart 2002; Darszon, Nishigaki et al. 2011; Lishko, Kirichok et al. 2012). Dabei wird diese Exozytose aber durch mindestens zwei sukzessive Erhöhungen der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst: Einem initialen, transienten Calcium-Signal und einem darauf folgenden, lang anhaltenden Anstieg der Calcium-Konzentration (Arnoult, Kazam et al. 1999; Breitbart 2002; Rahman, Kwon et al. 2014). Abbildung 3.4 gibt einen simplifizierten Überblick über die zwei gegenwärtig diskutierten, möglicherweise parallel ablaufenden und damit funktionell kompensatorisch wirkenden intrazellulären Signalkaskaden, die die Fusion von äußerer akrosomaler und Plasmamembran initiieren (Darszon, Nishigaki et al. 2011). Nach der Bindung eines möglichen Rezeptors an die *Zona*- und/oder *Cumulus*-Matrix (s. o.) kommt es zunächst zur Aktivierung eines $G_{i/o}$ -Proteins und in der Folge zu einer Erhöhung des pH-Wertes im Zytoplasma (Arnoult, Zeng et al. 1996). Die Alkalisierung führt dann zur Aktivierung des pH-sensitiven CatSper-Kanals im Flagellum und dadurch zu einem Einstrom von Calcium-Ionen (Kirichok, Navarro et al. 2006; Xia und Ren 2009), der sich als Calciumwelle auch über den Kopfbereich des Spermiums ausbreitet (Xia und Ren 2009).

Eine andere Theorie besagt dagegen, dass es, unabhängig von einem $G_{i/o}$ -Protein infolge des *Zona pellucida*-Kontaktes zu einer Aktivierung eines nicht-selektiven Kationen-Kanals (Na^+/Ca^{2+} -Kanal) und damit zu einer initialen Depolarisation der Spermienmembran kommt (Chan, Zhou et al. 1997). Dadurch werden Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle (Ca_v) aktiviert, die dem transienten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zugrunde liegen (Arnoult, Zeng et al. 1996; Wennemuth, Westenbroek et al. 2000; Darszon, Lopez-Martinez et al. 2006).

Beide zur transienten Calcium-Konzentrationserhöhung führenden Signalwege, die möglicherweise zur Sicherstellung einer erfolgreichen Fertilisation parallel ablaufen (Darszon, Nishigaki et al. 2011), aktivieren dann eine Calcium-sensitive Phospholipase C δ (PLC δ) (Fukami, Nakao et al. 2001). Die PLC spaltet dann Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in die beiden *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3). IP_3 kann nach der Bindung an einen IP_3 -Rezeptor (IP_3R) Calcium aus zwei im Spermienkopf lokalisierten intrazellulären Calcium-Speichern mobilisieren (Walensky und Snyder 1995; Ho und Suarez 2003; Herrick, Schweissinger et al. 2005; Costello, Michelangeli et al. 2009). Zum einen kann Calcium aus dem Akrosom (De Blas, Michaut et al. 2002; Fukami, Yoshida et al. 2003), das ein saures Lysosom-ähnliches Calcium-Speicherorganell darstellt (Hartree 1975; Arndt, Castonguay et al. 2014), zum anderen aus der

überschüssigen Kernhülle (*redundant nuclear envelope*, RNE) ins Zytosol strömen (Ho und Suarez 2003). Kürzlich konnte ein weiterer akrosomaler Calcium-Kanal identifiziert werden, der *two-pore channel 1* (TPC1), der zusätzlich Calcium-Ionen aus dem Akrosom mobilisieren kann (Arndt, Castonguay et al. 2014). Möglicherweise verstärkt der TPC über einen *Calcium-induced Calcium release*-Mechanismus (Matthews, Neher et al. 1989) die Aktivierung des IP₃-Rezeptors. Die Depletion der intrazellulären Speicher führt zu einem weiteren, deutlich stärkeren Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum (O'Toole, Arnoult et al. 2000), der entweder über *canonical transient receptor potential* (TRPC)-Kanäle oder einen *stromal interaction molecule* (STIM)/ORAI-vermittelten Mechanismus getragen wird (Darszon, Nishigaki et al. 2011). Diese zweite, relativ lang anhaltende Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zudem zu einer positiven Rückkopplungsschleife. Diese beinhaltet die Bildung von cAMP durch die SAC, die anschließende Aktivierung von EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*; Branham, Mayorga et al. 2006) und die Stimulierung einer weiteren PLC. In der Folge kommt es IP₃-vermittelt zu einer noch weiter verstärkten Calcium-Mobilisierung aus den intrazellulären Speicherorganellen (Branham, Bustos et al. 2009). EPAC-abhängig kommt es außerdem indirekt zu einer Rab3A-Aktivierung. Rab3 ist eine kleine Guanosintrisphosphat-Hydrolase (GTPase), die die „Weichen“ für die *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor* (SNARE)-Komplexbildung und damit für die anschließende SNARE-vermittelte Membranfusion stellt (De Blas, Roggero et al. 2005; Branham, Bustos et al. 2009). Zum anderen wird durch den langanhaltenden Calcium-Einstrom die finale, SNARE-vermittelte Membranfusion durch das Calcium-Sensorprotein Synaptotagmin (Davis, Bai et al. 1999) direkt initiiert (Hutt, Baltz et al. 2005). Die Prinzipien der SNARE-vermittelten Membranfusion, die nicht nur der akrosomalen Exozytose, sondern allen vesikulären Transportprozessen zugrunde liegen (Sollner, Whiteheart et al. 1993), werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

3.2 Die SNARE-Fusionsmaschinerie

Die SNARE-Protein-Familie repräsentiert die zentrale molekulare Maschinerie, die die Fusion von Vesikeln mit ihren Zielstrukturen sowohl bei Transportprozessen innerhalb einer Zelle als auch zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung vermittelt (Sollner, Whiteheart et al. 1993; Rothman 1994; Jahn und Scheller 2006). Durch die Interaktion von SNARE-Proteinen, die in den beiden gegenüberliegenden, zur Fusion vorgesehenen Membranen verankert sind, entsteht eine evolutionär hoch konservierte Struktur, der sogenannte SNARE-Komplex. Der SNARE-Komplex nähert die zu fusionierenden Membranen räumlich so einander an (Hanson, Heuser et al. 1997), dass die eigentliche Fusion der Lipiddoppelschichten energetisch möglich ist (Stein, Weber et al. 2009). Charakteristisch für den SNARE-Komplex ist der Strang von vier parallelen, ineinander verflochtenen α -Helices, den namensgebenden SNARE-Motiven. Im Inneren dieses Strangs befindet sich eine hydrophile Schicht mit drei Glutamin- (Q) und einem Arginin- (R) Rest (Sutton, Fasshauer et al. 1998) – eine konservierte Struktur, die zur Klassifizierung der SNARE-Motive in Q- und R-SNAREs geführt hat (Weimbs, Low et al. 1997; Fasshauer, Sutton et al. 1998). Die Q-SNARE-Motive werden weiter unterteilt in Qa-, Qb- und Qc-SNAREs, von denen je eines zusammen mit einem R-Motiv den SNARE-Komplex ausbildet (QabcR-SNARE-Komplex; Bock, Matern et al. 2001).

3.2.1 Die SNARE-regulierte Vesikelexozytose in Neuronen

Einer der am besten untersuchten kontrollierten Transportprozesse ist die Calcium-vermittelte Freisetzung von Neurotransmittern an der präsynaptischen Endigung von Neuronen, die der chemischen Signalweiterleitung dient (Katz 1979). Dabei werden die in synaptischen Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter vom präsynaptischen Neuron in den synaptischen Spalt sekretiert und diffundieren zur gegenüberliegenden Plasmamembran des postsynaptischen Neurons (Katz 1979). Dort binden sie an Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, durch die dann Kationen in das postsynaptische Neuron einströmen und die postsynaptische Zelle depolarisieren (Katz 1979). Da die Akrosomreaktion in Spermien nach einem analogen Funktionsprinzip abläuft wie die Vesikelfusion in Neuronen (Tomes 2007), wird im Folgenden die SNARE-vermittelte Membranfusion am Beispiel der Neurotransmitter-Exozytose an der chemischen Synapse beschrieben.

Die an der Exozytose der synaptischen Vesikel beteiligten SNARE-Proteine sind das R-SNARE *vesicle-associated membrane protein 2* (VAMP2), das Qa-SNARE Syntaxin 1 und das *synaptosomal-associated protein of 25 kDa* (SNAP-25), das sowohl ein Qb- als auch ein Qc-Motiv besitzt (Kloepper, Kienle et al. 2007). Die am Beginn des Exozytoseprozesses monomeren SNARE-Proteine SNAP-25 und Syntaxin 1 sind in der

Plasmamembran lokalisiert, wohingegen monomeres VAMP2 in der Vesikelmembran verankert ist (Sollner und Rothman 1996; Abbildung 3.5). Die Bildung des SNARE-Komplexes aus diesen drei Proteinen beginnt am N-Terminus der vier SNARE-Motive und setzt sich schnell in Richtung der C-terminalen Enden der SNARE-Motive fort (Sutton, Fasshauer et al. 1998; Stein, Weber et al. 2009). Da die einzelnen SNARE-Proteine in gegenüberliegenden Membranen (trans-Konfiguration) verankert sind, werden die fusionierenden Membranen bei der Entstehung des trimeren trans-SNARE-Komplexes stark zueinander gezogen (Hanson, Heuser et al. 1997). Durch die SNARE-Komplex-Bildung wird außerdem Energie frei, die für die Öffnung der Lipidschichten notwendig ist, sodass die „freien“ Membranenden von Vesikelmembran und Plasmamembran anschließend miteinander fusionieren können (Stein, Weber et al. 2009). So wird die Vesikelmembran in die Plasmamembran integriert, wodurch der SNARE-Komplex in der Energie-armen cis-Konfiguration vorliegt, d. h. alle beteiligten SNARE-Proteine befinden sich in derselben Membran (Abbildung 3.5; Sudhof und Rothman 2009). Die ATP-Hydrolase (ATPase) *N*-ethylmaleimid-sensitive factor (NSF) katalysiert anschließend zusammen mit dem Kofaktor α -SNAP die Dissoziation des trimeren cis-SNARE-Komplexes in die monomeren SNARE-Proteine (Hanson, Heuser et al. 1997). SNAP-25 und Syntaxin verbleiben in der Plasmamembran, wohingegen VAMP2 endozytiert wird und so dem Vesikelkompartiment für eine erneute Exozytose zur Verfügung steht (Sudhof und Rothman 2009). Die drei Proteine durchlaufen mit dem synaptischen Vesikelzyklus also einen steten Wechsel von SNARE-Komplexassoziation und -dissoziation, dessen Energie durch die ATPase NSF gespeist wird (Jahn und Fasshauer 2012).

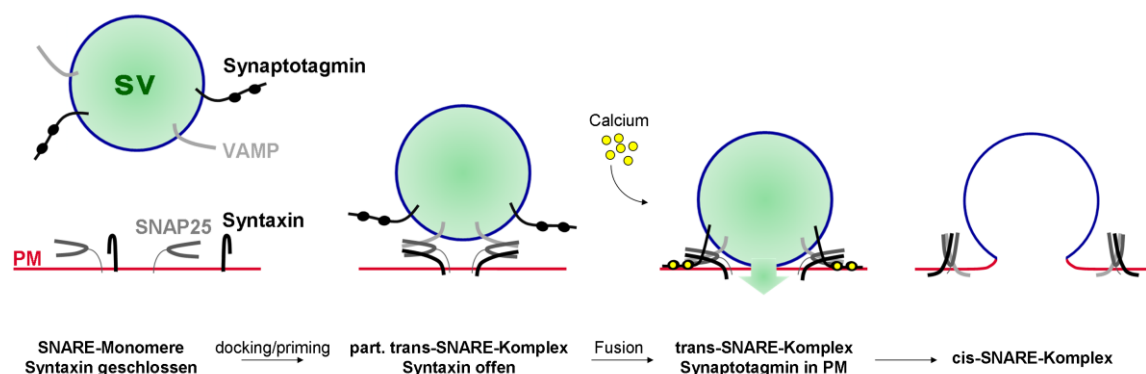


Abbildung 3.5: SNARE-regulierte Vesikelexozytose.

Die Bildung des SNARE-Komplexes ist das zentrale Ereignis, das die Fusion von Vesikel- und Plasmamembran (PM) bei der Exozytose der synaptischen Vesikel (SV) realisiert. Die monomeren SNARE-Proteine befinden sich zunächst in der Plasma- bzw. Vesikelmembran. Dabei liegt Syntaxin in seiner geschlossenen Konformation vor, was eine Ausbildung des trimeren SNARE-Komplexes verhindert. Erst durch die Prozesse des *docking/priming* wird Syntaxin in seine offene Konformation überführt, sodass es zu einer partiellen (part.) Ausbildung des trans-SNARE-Komplexes kommen kann. Die bei einem Aktionspotential durch Ca^{2+} -Kanäle einströmenden Calcium-Ionen bewirken durch ihre Bindung an die C2-Domänen des Calcium-Sensorproteins Synaptotagmin, dass diese in die Plasmamembran inserieren und so die Fusionspore ausbilden. Nach der Membranfusion und der damit verbundenen Freisetzung des Vesikelinhalts befinden sich die SNARE-Proteine in derselben Membran und liegen damit in der cis-Konfiguration vor. Nach einem Recycling-Prozess stehen sie einer erneuten Vesikelfusion zur Verfügung (nicht gezeigt).

Mechanistisch lässt sich die synaptische Vesikelexozytose in verschiedene Teilschritte gliedern, wobei die Übergänge nicht immer eindeutig abzugrenzen sind und die Einteilung in jüngster Zeit teilweise revidiert wurde (Verhage und Sorensen 2008; Gundelfinger und Fejtova 2012). Lange wurde zwischen der initialen Anlagerung des Vesikels an die Plasmamembran (*tethering*), der folgenden Stabilisierung der Verbindung (*docking*) und der Reifung des Vesikels (*priming*), bei der es die volle Fusionskompetenz erlangt, unterschieden (Li und Chin 2003). Die einzelnen Prozesse werden auf molekularer Ebene von einer gemeinsamen Schnittmenge an Proteinen oder gar denselben Molekülen ausgeführt (Verhage und Sorensen 2008), sodass sie sich nur schwer in distinkte Ereignisse einteilen lassen (Gundelfinger und Fejtova 2012).

Das SNARE-Protein Syntaxin 1 unterscheidet sich von den anderen beiden präsynaptischen SNAREs u. a. darin, dass es eine autoinhibitorische Domäne besitzt. In seiner inaktiven, geschlossenen Konformation maskiert diese das SNARE-Bindemotiv, sodass die Assoziation des SNARE-Komplexes verhindert wird (Dulubova, Sugita et al. 1999; Margittai, Widengren et al. 2003). Das ist der Grund dafür, dass sich die *in vitro* Fusion von Liposomen über Stunden erstreckt, obwohl der Prozess der SNARE-Komplexierung eigentlich eine exergone Reaktion ist (Pobbati, Stein et al. 2006). Nach dem Übergang von Syntaxin in seine offene Konformation ist hingegen die Bindestelle für SNAP-25 und Syntaxin frei und die Ausbildung des trimeren trans-SNARE-Komplexes kann stattfinden (Abbildung 3.5; Pobbati, Stein et al. 2006). Begünstigt wird die offene Syntaxin-Konformation und damit der *docking/priming* Prozess von den beiden SNARE-Regulatorproteinen Mammalia-Homolog des *Caenorhabditis elegans* UNC18-Proteins (Munc18) und Mammalia-Homolog des *Caenorhabditis elegans* UNC13 Proteins (Munc13) (Toonen und Verhage 2007; Burkhardt, Hattendorf et al. 2008; Ma, Li et al. 2011). Dennoch fusionieren synaptische Vesikel, die das *docking/priming* bereits durchlaufen haben, nicht automatisch mit der Plasmamembran – sie werden vermutlich durch ein weiteres SNARE-Regulatorprotein, das Complexin, in einem partiellen trans-SNARE-Komplex fixiert (Yang, Kaeser-Woo et al. 2010). Erst durch die Depolarisation der Plasmamembran infolge eines Aktionspotentials strömen Calcium-Ionen durch Ca_v-Kanäle in die synaptische Endigung und der SNARE-Komplex erhält seinen finalen Impuls zur Membranfusion (Jahn und Fasshauer 2012). Entscheidend dafür ist das in der Vesikelmembran verankerte Calcium-Sensorprotein Synaptotagmin, das zum einen die Complexin-Blockade aufhebt und zum anderen nach der Bindung von Calcium-Ionen mit seinen C2-Domänen in die Plasmamembran inseriert (Rizo, Chen et al. 2006). Dadurch werden Vesikel- und Plasmamembran noch weiter angenähert, was schließlich ihre Vereinigung hervorruft (Abbildung 3.5; Lee, Yang et al. 2010; Yang, Kaeser-Woo et al. 2010).

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen klassischen Modell der SNARE-vermittelten Membranfusion entstehen einer anderen Theorie zufolge während des *docking/priming* zunächst SNARE-Akzeptorkomplexe in der Plasmamembran, die aus

nur zwei SNARE-Proteinen (SNAP-25 und Syntaxin 1) bestehen (Wiederhold, Kloepper et al. 2010). Dieser Hypothese zufolge bewirkt das Calcium-abhängige Inserieren der C2-Domänen von Synaptotagmin in die Plasmamembran, dass der Plasmamembranständige SNARE-Akzeptorkomplex und das vesikuläre VAMP2 zusammengeführt werden und den SNARE-Komplex ausbilden können. Im Unterschied zum klassischen Modell kommt es also erst nach dem Calcium-Einstrom zur Ausbildung des trans-SNARE-Komplexes, der ohne partielle trans-SNARE-Intermediate sogleich die Membranfusion realisiert (Jahn und Fasshauer 2012). Es bleibt abzuwarten, welche der beiden Theorien in zukünftigen Experimenten bestätigt werden kann.

3.2.2 Die Zytomatrix der aktiven Zone

Wie schon in Abschnitt 3.2.1 angedeutet, benötigt die SNARE-Fusionsmaschinerie Regulationsmechanismen, die die Geschwindigkeit der Exozytose kontrollieren. Außerdem sind die exakte Position der Ausschüttung direkt gegenüber den postsynaptischen Rezeptoren und die zeitliche Präzision der Exozytose für die in einer Serie von Aktionspotentialen kodierten Signale innerhalb eines komplexen neuronalen Netzwerkes unabdingbar. Eine subzelluläre Struktur, die die Exozytose synaptischer Vesikel räumlich und zeitlich koordiniert und der durch ihr besseres Verständnis in den letzten Jahren eine wachsende Bedeutung bei der synaptischen Transmission zugeordnet wurde, ist die sogenannte *cytomatrix of the active zone* (CAZ; Sudhof 2012). Dieses dichte Proteinnetzwerk befindet sich am Ort der Vesikelexozytose, der aktiven Zone, und ist u. a. für die Positionierung der SNARE-vermittelten Vesikelexozytose direkt gegenüber der postsynaptischen Spezialisierung verantwortlich (Sudhof 2012). Des Weiteren ist die CAZ auch am *docking/priming* der synaptischen Vesikel, der Rekrutierung von Ca_v -Kanälen in die aktive Zone und der Regulation der Vesikelexozytose bei verschiedenen Formen der präsynaptischen Plastizität beteiligt (Sudhof 2012). Die Hauptbestandteile dieses evolutionär konservierten Netzwerks stellen sechs Gerüstproteinfamilien dar, die CAZ-Proteine Munc13, *Rab3-interacting molecule* (RIM), *RIM-binding protein* (RIM-BP), die Gruppe der beiden größten CAZ-Proteine Piccolo/Aczonin und Bassoon, das Protein reich an E, L, K, S/*Rab6-binding protein*/CAST (ELKS/ERC) und Liprin- α (Abbildung 3.6; Kaeser 2011; Gundelfinger und Fejtova 2012). Während ELKS/ERC und Liprin- α hauptsächlich aus *coiled-coil*-Domänen bestehen (Schoch und Gundelfinger 2006), sind die Munc13-, RIM-, RIM-Binde-, Piccolo/Aczonin- und Bassoon-Proteine komplexe Multi-Domänen-Proteine, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Interaktionsdomänen besitzen (Sudhof 2012). Auf Letztere wird daher im Folgenden genauer eingegangen.

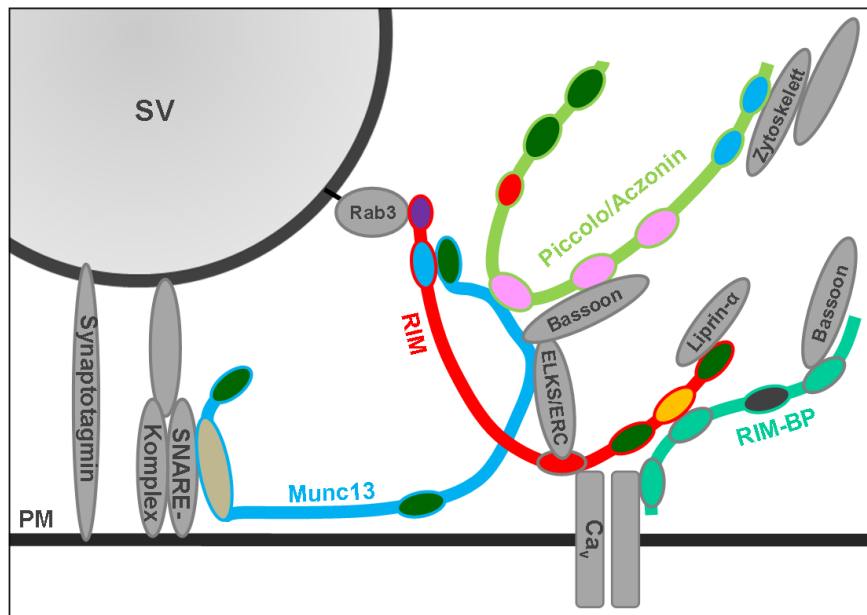


Abbildung 3.6: Netzwerkschema der CAZ-Proteine.

Die CAZ ist ein über multiple Interaktionen gebildeter Komplex aus sechs Proteinfamilien, die die Verankerung der synaptischen Vesikel in der aktiven Zone, ihre Fusionskompetenz und die Parameter ihrer Freisetzung regulieren. Die schematische Darstellung berücksichtigt die meisten, jedoch nicht alle der beschriebenen wechselseitigen Interaktionen zwischen den CAZ-Proteinen und ihrer Umgebung. Für Details der Interaktionen s. Abschnitte 3.2.2.1 bis 3.2.2.4.

3.2.2.1 Munc13

In Vertebraten sind vier *Munc13*-Gene (*Munc13-1* bis -4) bekannt, die für fünf Munc13-Proteine kodieren (Brose, Hofmann et al. 1995; Song, Ailenberg et al. 1998; Koch, Hofmann et al. 2000). Wie Abbildung 3.7 veranschaulicht, entsteht aus dem *Munc13-2*-Gen durch alternatives *Splicing* eine Gehirn-spezifische (*brain*, bMunc13-2) und eine ubiquitär exprimierte Variante (*ubiquitous*, ubMunc13-2) (Song, Ailenberg et al. 1998; Betz, Thakur et al. 2001). Munc13-Proteine sind modular aus verschiedenen Protein- bzw. *second messenger*-Bindedomänen aufgebaute Gerüstproteine. Gemeinsam ist allen Munc13-Proteinen die hoch konservierte, C-terminale Munc-Homologie-Domäne (MUN), die von zwei C2-Domänen (C2B und C2C) flankiert wird (Abbildung 3.7; Koch, Hofmann et al. 2000). Im Gegensatz dazu variieren die nicht verwandten N-Termini der Munc13-Proteine von Isoform zu Isoform (Abbildung 3.7, hellgraue Balken). Eine Ausnahme bilden dabei das Munc13-1-Protein und die ubiquitäre ubMunc13-2 *Splice*-Variante, die auch in ihrem N-Terminus homolog sind. Munc13-1 und ubMunc13-2 repräsentieren die einzigen Munc13-Proteine, die eine dritte, N-terminale C2A-Domäne und eine Bindestelle für das Calcium-Sensorprotein Calmodulin besitzen (Abbildung 3.7; Betz, Thakur et al. 2001; Rhee, Betz et al. 2002; Junge, Rhee et al. 2004). Mit Ausnahme des am N-Terminus stark verkürzten Munc13-4-Proteins ist die zentrale Bindedomäne für den *second messenger* DAG in allen Munc13-Proteinen vorhanden (Rhee, Betz et al. 2002; Junge, Rhee et al. 2004).

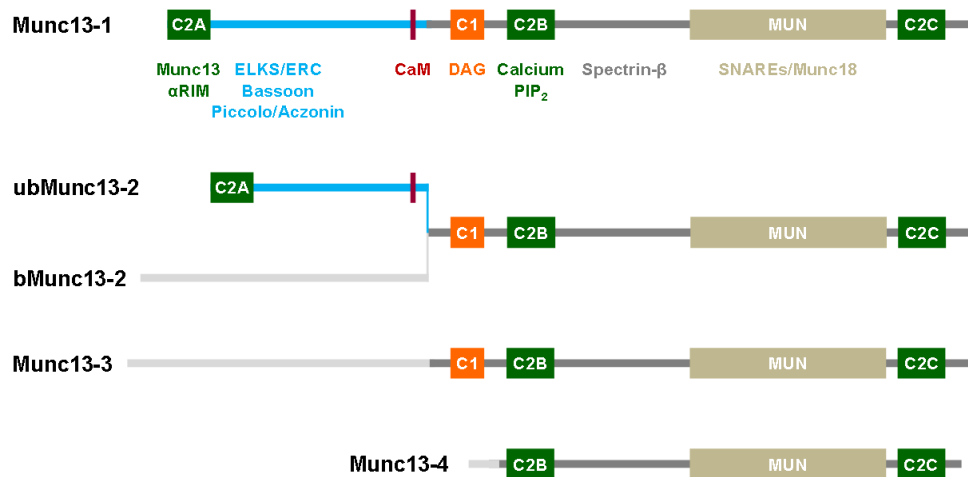


Abbildung 3.7: Strukturelle Domänen der Munc13-Isoformen und ihre Bindungspartner.

Die schematische Darstellung skizziert die verschiedenen Bindungsmotive der Munc13-Proteine Munc13-1 bis -4 und listet bekannte Bindungspartner unterhalb der jeweiligen Domäne in der korrespondierenden Farbe auf. Gemeinsam ist allen Munc13-Proteinen der konservierte C-terminale Teil (dunkelgrauer Balken), der die Munc-Homologie-Domäne (MUN, khakifarben) und zwei C2-Domänen (C2B und C2C, grün) umfasst. Die N-terminal der C2B-Domäne gelegene Bindungsstelle für den *second messenger* DAG kommt in allen langen Munc13-Proteinen vor und fehlt nur dem Munc13-4-Protein, sodass dessen C2B-Domäne direkt auf den Munc13-4-spezifischen N-Terminus folgt (hellgrauer Balken). Auch die Gehirn-spezifische bMunc13-2 *Splice*-Variante und Munc13-3 besitzen einen Isoform-spezifischen N-Terminus (hellgrauer Balken), wohingegen Munc13-1 und die ubiquitäre ubMunc13-2 *Splice*-Variante einen homologen N-Terminus aufweisen (hellblauer Balken). Nur in diesen beiden Isoformen sind die N-terminale Calcium/Calmodulin (CaM)-Bindestelle und die C2A-Domäne vorhanden, die sowohl die Homodimerisation der Munc13-Proteine als auch ihre Interaktion mit den RIM-Proteinen vermittelt. Die C2B-Domäne ist in der Lage, PIP_2 -abhängig Calcium-Ionen zu binden. Strukturelle Domänen sind als farbige Quader, das Polypeptidrückgrat als Balken im Hintergrund dargestellt. C1: C1-Domäne, roter Streifen: CaM-Bindestelle.

Munc13-Proteine sind vor allem bekannt für ihre Vesikel-*priming*-Funktion, da sie den Übergang von Syntaxin aus der geschlossenen in die offene Konformation fördern und damit die Ausbildung des SNARE-Komplexes ermöglichen (Richmond, Weimer et al. 2001; Ma, Li et al. 2011). Diese Funktion wird der C-terminalen MUN-Domäne zugeschrieben (Basu, Shen et al. 2005; Stevens, Wu et al. 2005), die mit Syntaxin und/oder dem SNARE-Komplex interagieren kann (Abbildung 3.7; Basu, Shen et al. 2005; Guan, Dai et al. 2008). Interessanterweise sind die beiden prädominanten Munc13-Proteine im Gehirn, Munc13-1 und ubMunc13-2 (Sudhof 2012), aber nicht *per se* in der Lage, ihre Vesikel-*priming*-Funktion auszuüben, sondern müssen selbst erst aktiviert werden (Deng, Kaeser et al. 2011). Im inaktiven Zustand liegen sie als Homodimere vor, die durch ihre C2A-Domänen verbunden sind. Erst durch die Bindung eines RIM-Proteins an die C2A-Domäne dissoziiert das Homodimer (Lu, Machius et al. 2006), und Munc13 kann im Heterodimer mit RIM seine *priming*-Funktion ausüben (Deng, Kaeser et al. 2011).

Neben dem Vesikel-*priming* selbst kann Munc13 durch seine *second messenger*-Bindestellen aber auch Aktivitäts-abhängige Veränderungen des *primings* vermitteln und trägt so zur präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität der Synapse bei. Z. B. kann die Calcium-bindende C2B-Domäne in Anwesenheit von Calcium und PIP_2 eine gesteigerte *priming*-Rate der Vesikel hervorrufen (Shin, Lu et al. 2010). Folglich resultiert aus einer schnellen Abfolge von Aktionspotentialen und einer damit einhergehenden, steigenden

präsynaptischen Calcium-Konzentration eine Vergrößerung des Pools fusionsbereiter Vesikel (*readily releasable pool*, RRP; Shin, Lu et al. 2010). Eine ähnliche Funktion während der präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität wird auch für die Calcium/Calmodulin- und DAG-Bindestellen vermutet (Rhee, Betz et al. 2002; Junge, Rhee et al. 2004).

Neben diesen funktionellen Interaktionen scheint Munc13-1 zusätzlich ein „molekularer Knotenpunkt“ sowohl für Zytoskelett-assoziierte Proteine (Spectrin- β ; Sakaguchi, Orita et al. 1998) als auch für die weiteren Proteine der CAZ zu sein und trägt damit zur Struktur des CAZ-Netzwerkes bei (Wang, Hu et al. 2009). So können RIM, ELKS/ERC, Bassoon und Piccolo/Aczonin an den N-Terminus von Munc13-1 binden (Abbildung 3.7). Welche Funktion dagegen den divergierenden N-Termini von bMunc13-2, Munc13-3 und Munc13-4 zukommt, ist bislang noch nicht geklärt (Sudhof 2012).

3.2.2.2 RIM

In Vertebraten existieren sieben RIM-Protein-Isoformen (Abbildung 3.8), die von vier *Rims*-Genen (*Rims1* bis *Rims4*) kodiert werden (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). Aus dem *Rims1*-Gen entstehen zwei (RIM1 α und RIM1 β), aus dem *Rims2*-Gen sogar drei verschiedene Isoformen (RIM2 α , RIM2 β und RIM2 γ), die von unabhängigen internen Promotoren generiert werden (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). Die *Rims3*- und *Rims4*-Gene kodieren hingegen lediglich für eine kurze RIM3 γ - bzw. RIM4 γ -Isoform (Wang, Sugita et al. 2000; Wang und Sudhof 2003).

RIM-Proteine sind, wie die Munc13-Proteine, aus verschiedenen, modularen Bindungsdomänen aufgebaut, wobei nicht alle Isoformen die komplette Domänenstruktur beinhalten (Abbildung 3.8). So besitzen z. B. nur die „langen“ oder α -RIM-Isoformen RIM1 α und RIM2 α die namensgebende N-terminale α -Helix, die die Interaktion mit der kleinen GTPase Rab3 vermittelt (Wang, Okamoto et al. 1997; Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). Die N-terminal verkürzten RIM1 β - und RIM2 β -Isoformen besitzen beide keine vollständige α -helikale Struktur und können daher nicht an Rab3 binden (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). Die α -Helix der α -Isoformen ist von einem Zinkfinger-Motiv umgeben, das die Munc13-bindende Domäne darstellt und das lediglich im RIM1 α -, RIM2 α - und RIM1 β -Protein vorhanden ist, im RIM2 β -Protein jedoch fehlt (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). Allen α - und β -Isoformen gemeinsam sind hingegen die zentrale PDZ- (*postsynaptic density protein 95/Drosophila junction protein discs-large/tight junction protein ZO-1*)- und C2A-Domäne, die C-terminale C2B-Domäne und eine *Src-homology 3* (SH3)-Domänen bindende Prolin-reiche Region (PRR) zwischen den beiden C2-Domänen (Abbildung 3.8; Wang, Sugita et al. 2000; Kaeser, Kwon et al. 2008). Die extrem verkürzten γ -Isoformen RIM2 γ , RIM3 γ und RIM4 γ bestehen lediglich aus einer kurzen γ -spezifischen Sequenz und der C-terminalen C2B-Domäne (Wang und

Sudhof 2003), die genauso wie die C2A-Domäne mutiert und daher nicht in der Lage ist, Calcium-Ionen zu binden (Wang, Okamoto et al. 1997). Zusätzlich zur oben beschriebenen Isoform-Diversität wird die Vielfalt der α - und β -RIM-Proteine durch intensives alternatives *Splicing* erhöht, das an drei verschiedenen *Splice*-Stellen stattfindet und mehr als 100 verschiedene *Splice*-Varianten produzieren kann (Wang, Sugita et al. 2000; Wang und Sudhof 2003).

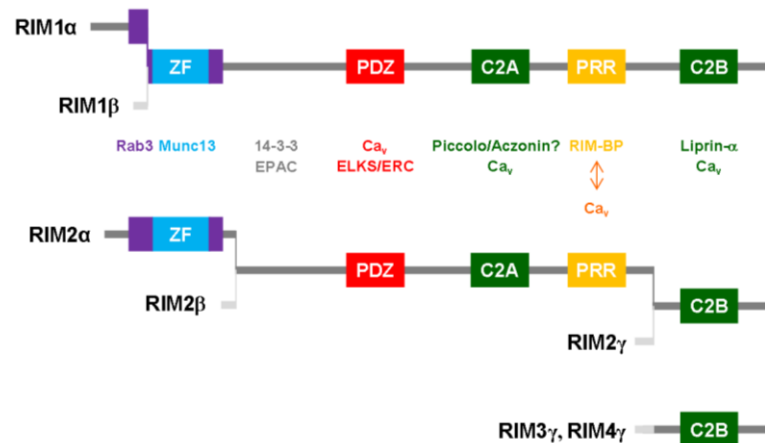


Abbildung 3.8: Domänenstruktur der RIM-Proteine und ihre Interaktionspartner.

Die schematische Darstellung stellt die modulare Domänenstruktur der verschiedenen RIM Isoformen dar, wobei die Interaktionspartner der jeweiligen Bindungsmodule durch gleiche Farbgebung gekennzeichnet sind (in Frage gestellte Interaktionen sind mit ?, indirekte Bindungen mit Pfeilen markiert). Nur die α -RIM-Proteine RIM1 α und RIM2 α besitzen die vollständige Domänenstruktur inklusive des N-terminalen Zinkfinger-Motivs (ZF, hellblau), das von der Rab3-bindenden α -Helix (violett) eingerahmt wird. Außerdem beinhalten α - und β -Isoformen eine zentrale PDZ-Domäne (PDZ, rot) und eine C-terminale Prolin-reiche Region (PRR, gelb), die von zwei C2-Domänen (C2A und C2B, grün) flankiert wird, die beide keine Calcium-Ionen binden können. Die einzige strukturelle Domäne der γ -Isoformen RIM2 γ , RIM3 γ und RIM4 γ ist die C2B-Domäne. Strukturelle Domänen sind als farbige Quader, das Polypeptidrückgrat als grauer Balken im Hintergrund dargestellt.

Obwohl der modulare Aufbau der RIM-Proteine mit ihren unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionsdomänen eine vernetzende, statische Rolle der RIM-Proteine in der CAZ vermuten lässt, üben sie eine bemerkenswerte Vielfalt von dynamischen Funktionen aus. So zeigen Untersuchungen an Gen-defizienten Mäusen, dass α -RIM-Proteine beim *docking/priming* von synaptischen Vesikeln (Schoch, Castillo et al. 2002; Deng, Kaeser et al. 2011; Han, Kaeser et al. 2011), bei der Rekrutierung von Calcium-Kanälen in die aktive Zone und damit bei der Kopplung von Calcium-Stimulus und Exozytose sowie bei verschiedenen Formen der präsynaptischen Kurzzeit-Plastizität eine Rolle spielen (Calakos, Schoch et al. 2004; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006; Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2012). Dabei scheinen einige RIM-Isoformen für bestimmte Funktionen redundant zu sein, wohingegen andere Funktionen in Gen-defizienten Tieren nur partiell durch die übrigen Isoformen kompensiert werden können (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006; Kaeser, Kwon et al. 2008; Kaeser, Deng et al. 2012). Eine Funktion, die vor allem RIM1 α , nicht aber RIM2 α zugeschrieben wird, ist die Regulation verschiedener Ausprägungen der präsynaptischen Langzeit-Plastizität (Castillo, Schoch et al. 2002; Schoch, Castillo et al.

2002; Huang, Zakharenko et al. 2005; Kaeser, Kwon et al. 2008). Dabei sind einige Formen der Langzeit-Plastizität nicht nur in RIM1 α -defizienten Mäusen, sondern auch in Rab3-defizienten Tieren beeinträchtigt (Castillo, Janz et al. 1997; Huang, Zakharenko et al. 2005; Tsetsenis, Younts et al. 2011). Folglich wird vermutet, dass eine gemeinsame, bislang noch nicht aufgeklärte Funktionsweise diesen Regulationen zugrunde liegt (Sudhof 2012).

Die funktionelle Rolle einiger Interaktionen der RIM-Proteine ist noch nicht geklärt, wie z. B. die Bindung der RIM-PDZ-Domäne an ELKS/ERC, dessen eigene Funktion noch ermittelt werden muss (Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002; Wang, Liu et al. 2002; Sudhof 2012). Teilweise ist auch unklar, welche Bedeutung einer *in vitro* nachgewiesenen Interaktion *in vivo* zukommt, wie bei der Assoziation von Piccolo/Aczonin und RIM2 diskutiert wird (Fujimoto, Shibasaki et al. 2002; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006; Mukherjee, Yang et al. 2010). Viele Funktionen der RIM-Proteine können jedoch direkt einzelnen oder mehreren ihrer Bindungspartner zugeordnet werden. Die Vielfalt der Interaktionspartner spiegelt dabei auch die Diversität der RIM-Funktionen wider. So ist z. B. die *priming*-Funktion der α -RIM-Proteine auf ihre Bindung an die Munc13-Proteine Munc13-1 und ubMunc13-2 zurückzuführen (Abbildung 3.8), wodurch diese aus ihrem inaktiven Homodimer entlassen und damit aktiviert werden (Deng, Kaeser et al. 2011).

Neben Munc13 interagieren α -RIM-Proteine außerdem mit Rab3, sofern es in seiner GTP-gebundenen Form vorliegt (Wang, Okamoto et al. 1997), in der es an synaptische Vesikel assoziiert ist (Burstein, Brondyk et al. 1993). Da RIM-Proteine zusätzlich an Ca_v-Kanäle in der Plasmamembran binden (Kaeser, Deng et al. 2011), bilden sie eine Verbindung zwischen den Kanälen in der Zellmembran und GTP-gebundenem Rab3 auf dem Vesikel, wodurch sie vermutlich das *docking* der Vesikel an die Plasmamembran der aktiven Zone ermöglichen (Hibino, Pironkova et al. 2002). Der Bindung der PDZ-Domäne der RIM-Proteine an Ca_v-Kanäle kommt darüber hinaus noch eine weitere Bedeutung zu: RIM-Proteine sind zusammen mit RIM-Bindeproteinen für die spezifische Rekrutierung der Ca_v-Kanäle vom P/Q- und N-Typ in die aktive Zone verantwortlich (Kaeser, Deng et al. 2011), die primär für den Calcium-Einstrom bei der Neurotransmission verantwortlich sind (Luebke, Dunlap et al. 1993; Castillo, Weisskopf et al. 1994; Poncer, McKinney et al. 1997). Dabei bilden RIM-Proteine mit RIM-Bindeproteinen und Ca_v-Kanälen einen trimeren Komplex, der zum einen durch eine indirekte Assoziation von RIM-Proteinen und Ca_v-Kanälen zustande kommt (Wang, Sugita et al. 2000), die durch die „Brückenproteine“, die RIM-BPs, hergestellt wird (Hibino, Pironkova et al. 2002). Zum anderen ist eine direkte Bindung der RIM-PDZ-Domäne an Ca_v-Kanäle für die spezifische Bindung bestimmter Subtypen der Ca_v-Kanäle verantwortlich (Kaeser, Deng et al. 2011). Durch die Lokalisation der Ca_v-Kanäle in unmittelbare Nähe der durch die Munc13-Aktivierung Fusionskompetenten Vesikel ist die Diffusionsstrecke der einströmenden Calcium-Ionen und

damit auch die Latenzzeit zwischen Aktionspotential und Vesikelexozytose minimiert (Han, Kaeser et al. 2011). Damit tragen RIM-Proteine direkt zur Regulation der Geschwindigkeit, der Menge und der Synchronität der Vesikelfreisetzung bei – Prozesse, die unter dem Begriff *positional priming* zusammengefasst werden (Neher und Sakaba 2008; Gundelfinger und Fejtova 2012).

3.2.2.3 RIM-Bindeproteine

Die RIM-Bindeproteine wurden, wie ihr Name annehmen lässt, ursprünglich als Interaktionspartner der RIM-Proteine entdeckt (Wang, Sugita et al. 2000). Insgesamt existieren in Vertebraten drei RIM-Bindeproteine (RIM-BP1 bis RIM-BP3), die auf drei *Rim-bp*-Gene zurückgehen (Wang, Sugita et al. 2000; Mittelstaedt und Schoch 2007). RIM-BP1- und RIM-BP2-mRNA konnte hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen werden, wohingegen RIM-BP3 auch in non-neuronalem Gewebe, vor allem im Hoden exprimiert wird (Mittelstaedt und Schoch 2007; Zhou, Du et al. 2009). RIM-Bindeproteine bestehen aus einer zentralen und zwei C-terminalen SH3-Domänen, zwischen denen sich zwei bis drei zentrale Fibronectin III-Domänen befinden (Abbildung 3.9; Wang, Sugita et al. 2000; Mittelstaedt und Schoch 2007). Nur im RIM-Bindeprotein 3 befinden sich am N-Terminus zusätzlich noch Arginin-, Serin- und Prolin-reiche Regionen (Mittelstaedt und Schoch 2007).

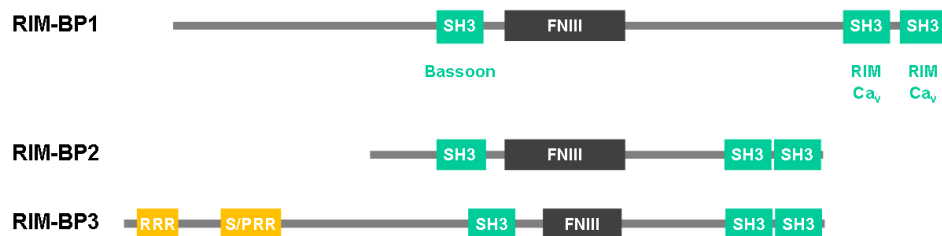


Abbildung 3.9: Strukturelle Domänen der RIM-Bindeproteine.

Das Schema veranschaulicht die Domänenstruktur der RIM-Bindeproteine RIM-BP1 bis RIM-BP3 und gibt bekannte Interaktionspartner unterhalb der jeweiligen Domäne in der korrespondierenden Farbe an. RIM-Bindeproteine besitzen jeweils drei *Src-homology 3*-Domänen (SH3, türkis) und zwei (RIM-BP3) bzw. drei (RIM-BP1 und 2) Fibronectin III-Domänen (FNIII, dunkelgrau). RIM-BP3 verfügt zudem über N-terminale Arginin- (RRR, gelb), Serin- und Prolin-reiche Regionen (S/PRR, gelb). Strukturelle Domänen sind als farbige Quader, das Polypeptidrückgrat als grauer Balken im Hintergrund dargestellt.

Die Assoziation der RIM-Bindeproteine und RIM-Proteine basiert auf einer starken Interaktion vor allem der C-terminalen SH3-Domänen der RIM-Bindeproteine an die PRR der RIM-Proteine (Wang, Sugita et al. 2000; Sudhof 2012; Davydova, Marini et al. 2014). Die C-terminalen SH3-Domänen sind außerdem für die Assoziation von RIM-BPs an Ca_v-Kanäle verantwortlich (Hibino, Pironkova et al. 2002; Kaeser, Deng et al. 2011). Die zentrale SH3-Domäne kann zwar auch mit RIM-Proteinen und Ca_v-Kanälen interagieren (Wang, Sugita et al. 2000; Hibino, Pironkova et al. 2002), bindet jedoch mit höherer Affinität an das CAZ-Protein Bassoon (Davydova, Marini et al. 2014). Da die verschiedenen Interaktionspartner simultan mit RIM-BPs interagieren können, scheinen

RIM-Bindeproteine für die Kopplung von RIM-Proteinen, Ca_v -Kanälen und Bassoon zuständig zu sein (Davydova, Marini et al. 2014). Dieser Komplex kann dann die Rekrutierung der Ca_v -Kanäle in die aktive Zone, also das *positional priming* der synaptischen Vesikel vermitteln (Davydova, Marini et al. 2014).

Allerdings können RIM-Bindeproteine sowohl mit synaptischen N- und P/Q-Typ als auch mit non-synaptischen L-Typ Kanälen interagieren (Hibino, Pironkova et al. 2002). Folglich können sie Ca_v -Kanäle im Allgemeinen, nicht aber spezifisch die synaptischen Kanäle rekrutieren. Im Gegensatz dazu kann die PDZ-Domäne der RIM-Proteine lediglich mit N- und P/Q-Typ Kanälen interagieren (Kaesler, Deng et al. 2011) und der Komplex aus RIM-BPs und Bassoon sogar ausschließlich P/Q-Typ Kanäle binden (Davydova, Marini et al. 2014). Somit scheint die Differenzierung zwischen den Kanal-Isotypen offensichtlich den Interaktionspartnern der RIM-Bindeproteine zu obliegen. Da die differentielle Rekrutierung bestimmter Kanaltypen die Feinabstimmung der Neurotransmission beeinflussen kann (Ahmed und Siegelbaum 2009; Ermolyuk, Alder et al. 2013), könnte die Interaktion von RIM-Bindeproteinen mit Bassoon und RIM-Proteinen während der synaptischen Plastizität eine wichtige Rolle spielen (Davydova, Marini et al. 2014).

3.2.2.4 Bassoon und Piccolo/Aczonin

Die Namen der beiden größten CAZ-Proteine Bassoon (> 400 kDa) und Piccolo/Aczonin (> 500 kDa; Cases-Langhoff, Voss et al. 1996; tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998; Wang, Kibschull et al. 1999) deuten sowohl ihre multiple Domänenstruktur (Bassoon: englisch für das Holzblasinstrument Fagott, dessen Name sich wiederum aus seiner mehrteiligen Bauweise ergibt) als auch ihre hohe molekulare Masse (Bassoon: das Fagott ist das größte Holzblasinstrument, Piccolo: italienisch für klein, ironische Bezeichnung; die Piccoloflöte ist auch das kleinste Holzblasinstrument) sowie ihre Assoziation an die aktive Zone (Aczonin) an. Bassoon und Piccolo/Aczonin kommen ausschließlich in Vertebraten vor und weisen beträchtliche Homologien zueinander auf (Cases-Langhoff, Voss et al. 1996; tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998; Wang, Kibschull et al. 1999). Die homologen Sequenzen werden Piccolo-Bassoon-Homologie (PBH)-Domänen genannt und sind vom N- zum C-Terminus der Proteine nummeriert (Abbildung 3.10, 1-10). Die ersten beiden PBH-Domänen beinhalten jeweils ein ZF-Motiv, während die PBH-Domänen 4, 6 und 8 über jeweils eine *coiled-coil*-Domäne verfügen (Fenster, Chung et al. 2000). Piccolo/Aczonin besitzt zusätzlich noch eine PDZ-Domäne und zwei C2-Domänen, die in seinem C-Terminus lokalisiert sind (Abbildung 3.10). Während die C2A-Domäne nach Calcium-Bindung eine Konformationsänderung eingeht, kann die C2B-Domäne kein Calcium binden, unterliegt jedoch einer Regulation durch alternatives *Splicing* (Wang, Kibschull et al. 1999; Gerber, Garcia et al. 2001; Garcia, Gerber et al. 2004).

Piccolo/Aczonin und Bassoon können mit sich selbst, mit einander und mit weiteren CAZ-Proteinen interagieren (Abbildung 3.10; Gerber, Garcia et al. 2001; Fujimoto, Shibasaki et al. 2002; Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002; Takao-Rikitsu, Mochida et al. 2004; tom Dieck, Altmann et al. 2005; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006; Wang, Hu et al. 2009; Mukherjee, Yang et al. 2010). Darüber hinaus bindet Piccolo/Aczonin Zytoskelett-assoziierte Proteine wie das Aktin-Bindeprotein 1 (ABP-1), den *pre*nylated *Rab* *a*ccceptor 1 (PRA1), den *ADF*-*ribosylation* *f*actor *GTPase*-*a*ctivating *p*rotein (GIT) und Profilin (Wang, Kibschull et al. 1999; Fenster, Chung et al. 2000; Fenster, Kessels et al. 2003; Kim, Ko et al. 2003). Daher scheint es bei der Verankerung der CAZ im Zytoskelett der aktiven Zone eine essentielle Rolle zu spielen (Waites, Leal-Ortiz et al. 2011).

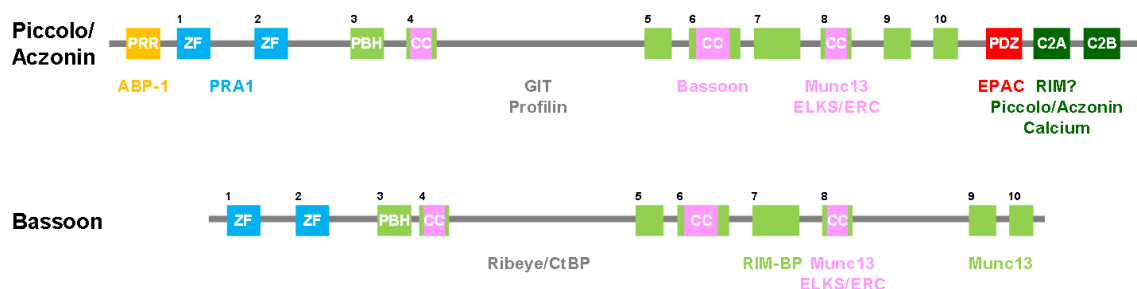


Abbildung 3.10: Schema der Domänenstruktur von Piccolo/Aczonin und Bassoon.

Die Abbildung veranschaulicht die modulare Domänenstruktur von Piccolo/Aczonin und Bassoon und gibt die homologen und individuellen Domänen der beiden Proteine an und listet ihre Interaktionspartner unterhalb der jeweiligen Domäne in der korrespondierenden Farbe auf (in Frage gestellte Interaktionen sind mit ? markiert). Die Piccolo-Bassoon-Homologie (PBH)-Domänen sind durchnummeriert (1-10). Die ersten beiden PBH-Domänen sind zwei Zinkfinger motive ([ZF], hellblau), die PBH-Domänen 4, 6 und 8 beinhalten jeweils eine *coiled-coil*-Domäne ([CC], rosa). Piccolo/Aczonin besitzt vier zusätzliche, individuelle Bindemotive, die im Bassoon-Protein nicht vorhanden sind. Dazu gehören eine N-terminale Prolin-reiche Region ([PRR], gelb), eine PDZ-Domäne ([PDZ], rot) sowie zwei C2-Domänen ([C2A] und [C2B], dunkelgrün), die am C-Terminus von Piccolo/Aczonin lokalisiert sind. Strukturelle Domänen sind als farbige Quader, das Polypeptidrückgrat als grauer Balken im Hintergrund dargestellt.

Piccolo/Aczonin und Bassoon erfüllen teilweise redundante Funktionen bei der Bildung und der Aufrechterhaltung von synaptischen Verbindungen (Mukherjee, Yang et al. 2010; Waites, Leal-Ortiz et al. 2013; Mendoza Schulz, Jing et al. 2014). Neben dieser homöostatischen Unterstützung von Synapsen scheinen sie aber auch divergierende Funktionen auszuüben, die die synaptische Transmission direkt beeinflussen. So ist für Bassoon-defiziente Synapsen z. B. eine eingeschränkte Neurotransmission beschrieben (Altmann, tom Dieck et al. 2003; Dick, tom Dieck et al. 2003; Khimich, Nouvian et al. 2005; Frank, Rutherford et al. 2010; Hallermann, Fejtova et al. 2010), die möglicherweise auf die unter Abschnitt 3.2.2.3 beschriebene Rolle von Bassoon während des *positional priming* von synaptischen Vesikeln zurückzuführen ist (Jing, Rutherford et al. 2013; Davydova, Marini et al. 2014). Im Gegensatz dazu führt das Fehlen von Piccolo/Aczonin in glutamatergen Synapsen dazu, dass synaptische Vesikel vermehrt exozytiert werden (Leal-Ortiz, Waites et al. 2008; Waites, Leal-Ortiz et al. 2011). Die Ursache dafür scheint im Ausbleiben der Polymerisation von G-Aktin zu

F-Aktin durch die fehlende Rekrutierung von Aktin-Bindeproteinen und Signalmolekülen wie der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) zu liegen (Waites, Leal-Ortiz et al. 2011). Warum und wie genau die beiden Mitglieder der Piccolo-Bassoon-Proteinfamilie solch gegensätzliche Funktionen bei der synaptischen Transmission einnehmen, ist bislang jedoch noch nicht geklärt.

3.2.3 SNARE-Fusion bei der akrosomalen Exozytose

Wie in Abschnitt 3.1.4 erwähnt, ist die Akrosomreaktion ein Calcium-vermittelter Exozytoseprozess, der in vielen Merkmalen mit der Calcium-abhängigen Neurotransmitterfreisetzung vergleichbar ist (Tomes 2007). Neben der Tatsache, dass der Einstrom von Calcium ins Zytoplasma der entscheidende Reiz für die Fusion der akrosomalen Membran mit der Plasmamembran ist (s. Abschnitt 3.1.4), weist die Akrosomreaktion weitere mechanistische und auch molekulare Parallelen zur Ausschüttung von synaptischen Vesikeln auf (Mayorga, Tomes et al. 2007). So konnten in Spermien die einzelnen Teilschritte der Exozytose synaptischer Vesikel beobachtet werden. Dazu gehören die Reifung des Vesikels an der Plasmamembran (*docking/priming*), durch die es die volle Fusionskompetenz erlangt (Tulsiani und Abou-Haila 2004; Tsai, Garcia-Gil et al. 2010) und die anschließende Calcium-medierte Fusion der Lipiddoppelschichten (De Blas, Roggero et al. 2005). Auf molekularer Ebene wird die Membranfusion ebenfalls wie an der Präsynapse durch die kleine GTPase Rab3 gefördert (Iida, Yoshinaga et al. 1999; Michaut, Tomes et al. 2000; Lopez, Belmonte et al. 2007). Die Proteine der SNARE-Familie (De Blas, Roggero et al. 2005) realisieren nach ihrer Aktivierung durch die ATPase NSF und ihren Kofaktor α SNAP (Michaut, Tomes et al. 2000; Tomes, De Blas et al. 2005) die durch das Calcium-Sensorprotein Synaptotagmin initiierte Fusion (Hutt, Baltz et al. 2005).

Es gibt allerdings auch entscheidende Unterschiede zwischen Akrosomreaktion und Neurotransmitterfreisetzung, die bereits anhand der Morphologie der Spermien (Abbildung 3.2) deutlich werden. Im Gegensatz zu der Vielzahl kleiner synaptischer Vesikel an der präsynaptischen Endigung, die einem Zyklus von Exozytose und Recycling unterliegen (Sudhof 2004), ist das Akrosom ein einzelnes, riesiges Vesikel (Burgess und Kelly 1987), dessen Inhalt nur einmal freigesetzt werden kann (Mayorga, Tomes et al. 2007). Außerdem unterscheiden sich die an der akrosomalen Exozytose von Säugerspermien beteiligten SNARE-Proteine z. T. von denen der synaptischen Vesikelexozytose (Tomes, Michaut et al. 2002; Tsai, Brewis et al. 2012), weswegen im Folgenden speziell auf die Mechanismen der SNARE-medierten Membranfusion bei der Akrosomreaktion eingegangen wird.

3.2.3.1 Akrosomale SNARE-Komplexe

Die Komplexbildung der an der Akrosomreaktion beteiligten SNARE-Proteine wurde besonders intensiv und umfassend am gemeinen Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) untersucht. Daher sollen im Folgenden beispielhaft anhand dieser Säugerspezies die SNARE-Komplexe beschrieben werden, die sich während der Kapazitation und der nachfolgenden Akrosomreaktion bilden. Bereits während der Kapazitation der Spermien entstehen erste trans-SNARE-Komplexe aus den Q-SNAREs Syntaxin 1B und SNAP-23 und dem R-SNARE VAMP3 (Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). Von diesen SNARE-Komplexen wird vermutet, dass sie für das initiale *docking* des akrosomalen Vesikels an die Plasmamembran verantwortlich sind und damit das molekulare Pendant darstellen, das der Kapazitations-abhängigen engen Anlagerung von äußerer akrosomaler und Plasmamembran zugrunde liegt (Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). Interessanterweise führt eine Erhöhung der Calcium-Konzentration, wie sie z. B. während der Akrosomreaktion registriert wurde (Abbildung 3.4), zur Dissoziation dieses Kapazitations-bedingten SNARE-Komplexes und nicht, wie man erwarten könnte, zur Calcium-induzierten Fusion der beiden gedockten Membranen (Tsai, Brewis et al. 2012). Stattdessen kommt es ebenfalls Calcium-abhängig zur Assoziation eines weiteren SNARE-Komplexes in anderer Zusammensetzung. Dieser zweite SNARE-Komplex besteht aus dem Qa-SNARE Syntaxin 3, dem Qbc-SNARE SNAP-23 und dem R-SNARE VAMP2 und ist für die Vermittlung der eigentlichen Fusion von äußerer akrosomaler und Plasmamembran verantwortlich (Tsai, Brewis et al. 2012). Als mögliche Erklärung dafür wird gegenwärtig nachfolgende Überlegung diskutiert. Da die Akrosomreaktion insgesamt eine verhältnismäßig große Fläche des Spermienkopfes einnimmt (Zanetti und Mayorga 2009), aber dennoch relativ schnell abläuft (ca. 10 Sekunden; Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009; Jin, Fujiwara et al. 2011), wird vermutet, dass die beiden unterschiedlichen SNARE-Komplexe diese besonderen räumlichen und temporalen Merkmale der Akrosomreaktion auf molekularer Ebene ermöglichen. Die Bildung des ersten, Kapazitations-bedingten SNARE-Komplexes könnte möglicherweise die beiden Membranen in dem Bereich des Akrosoms einander annähern, in dem später die Fusion stattfinden soll. Dies könnte die Bildung und korrekte Lokalisation des zweiten, die Fusion vollführenden SNARE-Komplexes erleichtern (Tsai, Brewis et al. 2012).

3.2.3.2 Membrane rafts

Neben der soeben beschriebenen SNARE-vermittelten räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Akrosomreaktion, liegt der spezialisierten Membranfusion an der akrosomalen Synapse ein weiterer Regulationsmechanismus zugrunde. Die Konzentrierung von an der Fusion beteiligten Komponenten in Membranflöschchen oder *membrane rafts* trägt zusätzlich zur Bildung der Pseudovesikel während der

Akrosomreaktion bei (Tsai, Brewis et al. 2012). Laut Definition sind *membrane rafts* „kleine (10–200 nm), heterogene, sehr dynamische, Sterin- und Sphingolipid-reiche Domänen, die zelluläre Prozesse kompartmentieren. Kleine *rafts* können manchmal durch Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen stabilisiert werden, sodass größere Plattformen entstehen“ (Pike 2006). Solche Membranmikrodomänen stellen eine effektives Prinzip dar, um die Komponenten einer Signaltransduktionskaskade zu konzentrieren, was aufgrund verkürzter Diffusionswege zu einer schnelleren Signalweiterleitung führt (Bray 1998). Tatsächlich werden nicht nur die für die Membranfusion verantwortlichen SNARE-Proteine in Spermien in solchen *membrane rafts* akkumuliert (Travis, Merdushev et al. 2001; Lang 2007; Tsai, De Vries et al. 2007; Boerke, Tsai et al. 2008; Tsai, Brewis et al. 2012), sondern auch die für die *Zona pellucida*-Erkennung verantwortlichen Moleküle an der Stelle der Spermien-Oozyten-Interaktion in Membranflöschchen konzentriert (Tanphaichitr, Carmona et al. 2007; Boerke, Tsai et al. 2008; Nixon, Bielanowicz et al. 2009).

Bemerkenswert ist dabei, dass während der Kapazitation eine Reduktion des Netto-Cholesteringehalts der Spermienmembran zu beobachten ist (Brewis, Moore et al. 2005), von der das in *membrane rafts* eingebundene Cholesterin jedoch nicht betroffen ist (van Gestel, Brewis et al. 2005; Boerke, Tsai et al. 2008). Stattdessen führt die Kapazitation zu einer Aggregation der *membrane rafts* zu größeren Plattformen, die sich am apikalen Rand der akrosomalen Region konzentrieren (Abbildung 3.11; van Gestel, Brewis et al. 2005). Diese Kapazitations-abhängige Bildung von *membrane raft*-Plattformen scheint einen positiven Einfluss auf die Größe und Regelmäßigkeit der bei der Akrosomreaktion entstehenden Pseudovesikel zu haben und könnte damit zur Koordination der akrosomalen Exozytose beitragen (Tsai, Brewis et al. 2012).

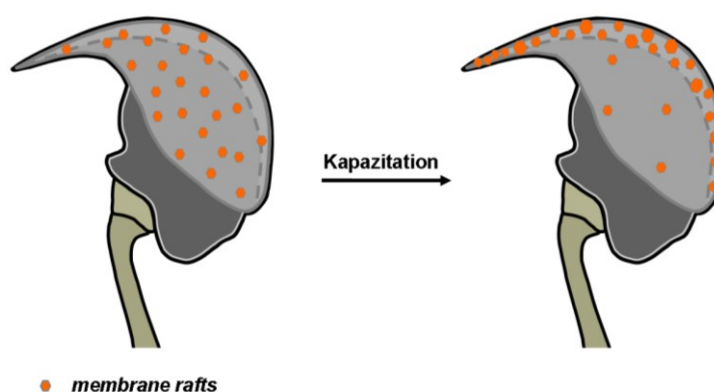


Abbildung 3.11: Aggregation und Umverteilung von *membrane rafts* während der Kapazitation.

Zu den Veränderungen der Plasmamembran der Spermien, die während der Kapazitation stattfinden, zählen die Vergrößerung und Konzentration der *membrane rafts* am apikalen Rand des Spermienkopfes. Abbildung modifiziert nach Zitranski, Borth et al. 2010.

3.2.3.3 Das Multi-PDZ-Domänen Protein 1

Neben den *Zona pellucida*-Erkennungsmolekülen und SNARE-Proteinen ist in Spermien außerdem das Gerüstprotein Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (MUPP1) in *membrane rafts* lokalisiert, dessen funktionelle Beteiligung an der Akrosomreaktion bereits gezeigt werden konnte (Heydecke, Meyer et al. 2006; Ackermann, Zitranski et al. 2008). Wie der Name vermuten lässt, besteht MUPP1 aus einer Vielzahl von PDZ-Domänen, besitzt selbst jedoch keine katalytische Aktivität (Ullmer, Schmuck et al. 1998). MUPP1 wird im Gehirn sowie in verschiedenen peripheren Organen exprimiert (Ullmer, Schmuck et al. 1998) und ist in seiner Funktion als Gerüstprotein vor allem für die Organisation und Erhaltung von Signalkomplexen verantwortlich. Z. B. ist es an Zell-Zell-Verbindungen wie *Zonulae adherentes*, *occludentes* und *gap junctions* lokalisiert (Hamazaki, Itoh et al. 2002; Liew, Vockel et al. 2009; Lynn, Li et al. 2012). Des Weiteren ist MUPP1 für die Komplexierung von olfaktorischen Rezeptoren (Baumgart, Jansen et al. 2014), postsynaptischen Serotonin- (Parker, Backstrom et al. 2003) und Melatonin-Rezeptoren (Guillaume, Daulat et al. 2008) und ihren nachgeschalteten Signalwegen in Neuronen verantwortlich. Dabei kann es sowohl die Rekrutierung der Rezeptoren in bestimmte Signalkomplexe (Liew, Vockel et al. 2009) als auch die physische Nähe von GPCRs und G-Proteinen gewährleisten (Guillaume, Daulat et al. 2008) und damit die Reizweiterleitung eines Rezeptors maßgeblich beeinflussen. Ein weiteres Beispiel für eine solche regulatorische Funktion von MUPP1 in Neuronen ist die simultane Interaktion von MUPP1 mit der CaMKII und dem synaptischen GTPase aktivierenden Protein (SynGAP), die es ermöglicht, dass SynGAP von der CaMKII phosphoryliert werden kann (Krapivinsky, Medina et al. 2004).

In Spermien wird für MUPP1 eine ähnliche Gerüstfunktion wie in Neuronen vermutet, bei der es zusätzlich zur Komplexierung von Signaltransduktionsmolekülen die Konzentration der beteiligten Proteine in *membrane rafts* gewährleisten könnte (Ackermann, Zitranski et al. 2008; Zitranski, Borth et al. 2010). Erste Hinweise darauf konnten *in vitro* Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen des MUPP1-Proteins und testikulärer CaMKII geben (Dissertation Frauke Ackermann, 2008). Die α -Isoform der CaMKII ist im akrosomalen Bereich von Spermien verschiedener Spezies lokalisiert und außerdem in *membrane rafts* von Rattenspermien konzentriert (Dissertation Frauke Ackermann, 2008). Während für den Aktivator der CaMKII, das Calcium-Sensorprotein Calmodulin (Chin und Means 2000; Hook und Means 2001; Hudmon und Schulman 2002), bereits vielfältige Funktionen in Spermien beschrieben sind (Yunes, Tomes et al. 2002; Ignatz und Suarez 2005; Gonzalez-Fernandez, Macias-Garcia et al. 2012), ist hingegen die funktionelle Rolle der CaMKII bei der Akrosomreaktion bislang weitgehend ungeklärt (Ignatz und Suarez 2005; Dissertation Frauke Ackermann, 2008).

3.3 Zielsetzung

Für die Befruchtung einer Eizelle ist die Interaktion zwischen den beiden Erkennungsmolekülen Izumo (Spermium) und Juno (Oocyte) essentiell (Bianchi, Doe et al. 2014). Da die Affinität zwischen den Interaktionspartnern sehr gering ist (Bianchi, Doe et al. 2014), erscheint es für die Verbindung von Spermium und Oocyte wichtig, dass eine höhere Avidität gewährleistet wird, die durch eine ausreichende Anzahl an Interaktionen zwischen Izumo und Juno die geringe Affinität der Bindung kompensiert (Bianchi, Doe et al. 2014). Izumo wird allerdings erst nach der Exozytose des akrosomalen Vesikels auf der „neuen“ Spermienplasmamembran exponiert und damit für die Bindung an Juno zugänglich (Sebkova, Ded et al. 2014). Folglich ist der vollständige Ablauf der Akrosomreaktion über einen Großteil der Kopfoberfläche eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Fertilisation und damit für den Fortbestand einer Spezies (Allen und Green 1997; Zanetti und Mayorga 2009; Abbildung 3.3). Von vergleichbar großer physiologischer Bedeutung für einen Organismus ist die präzise Koordination der Freisetzung von Neurotransmittern an der Präsynapse von Neuronen, die im Wesentlichen durch die Gerüstproteine des präsynaptischen CAZ-Netzwerkes sichergestellt wird (zur Übersicht s. Fejtova und Gundelfinger 2006; Sudhof 2012). Da in den letzten Jahren einige Parallelen zwischen der Vesikelexozytose an neuronalen Synapsen und der akrosomalen Exozytose in Spermien aufgezeigt werden konnten (Tulsiani und Abou-Haila 2004; Lopez, Belmonte et al. 2007; Tomes 2007; Gadella und Evans 2011; Abschnitt 3.2.3), soll in der vorliegenden Arbeit nun geprüft werden, ob ein CAZ-ähnliches Proteinnetzwerk als molekulare Basis für die Regulation der multiplen Fusionsporenbildung während der Akrosomreaktion in Frage kommt.

Mit Hilfe verschiedener biochemischer und zellbiologischer Methoden soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst geprüft werden, ob die beiden größten CAZ-Proteine Bassoon und Piccolo/Aczonin und die derzeit am besten charakterisierten CAZ-Proteine der RIM- und der Munc13-Familie (Gundelfinger und Fejtova 2012; Sudhof 2012) in Nagerspermien exprimiert werden und welche subzelluläre Lokalisation sie dort einnehmen. Beim Nachweis von CAZ-Proteinen gilt es zu bedenken, dass nicht alle Isoformen der CAZ-Proteine miteinander und mit den Komponenten des Exozytoseapparates interagieren können (Sudhof 2012). In der bisher einzigen Studie, die eine mögliche funktionelle Rolle von RIM- und Munc13-Proteinen für die Akrosomreaktion in humanen Spermien beschreibt und die während der laufenden experimentellen Studien dieser Dissertation erschien, wurde jedoch keine Differenzierung zwischen verschiedenen RIM- und Munc13-Isoformen vorgenommen (Bello, Zanetti et al. 2012). Daher soll in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf der Identifikation der in Spermien exprimierten Isoformen dieser beiden CAZ-Protein-Familien gelegt werden. Diese Arbeiten sollen durch *in vitro*

Interaktionsstudien in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen zur Identifikation von testikulären Bindungspartnern des RIM-Proteins, das als molekularer Knotenpunkt des CAZ-Netzwerkes angesehen wird (Sudhof 2012), ergänzt und verifiziert werden. Die Beteiligung verschiedener Bindungsmodule der CAZ-Proteine an der Akrosomreaktion soll zudem systematisch in funktionellen Studien überprüft werden. Da sich die physiologische Relevanz eines Proteins am eindeutigsten durch seine Deletion klären lässt (Friebe und Koesling 2009), soll der Reproduktionsphänotyp von genetisch veränderten Mäusen bestimmt werden, die für die in dieser Arbeit als Hauptisoform der RIM-Familie in Nagerspermien identifizierte RIM2 α -Isoform defizient sind (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Dabei sind neben morphologischen Analysen an männlichen Reproduktionsorganen und Spermien der RIM2 α -*knockout*-Mäuse vor allem quantitative Akrosomreaktionsstudien mit artifiziellen und physiologischen Stimuli geplant.

Das neuronale Gerüstprotein MUPP1 konnte bereits in Spermien identifiziert und seine funktionelle Rolle während der Akrosomreaktion von Säugerspermien aufgezeigt werden (Ackermann, Zitranski et al. 2008). Das durch 13 PDZ-Bindungsmodule gekennzeichnete MUPP1 interagiert in Hippocampus-Neuronen mit der CaMKII (Krapivinsky, Medina et al. 2004), von der bekannt ist, dass sie die synaptische Transmission regulierend beeinflusst (Hudmon und Schulman 2002; Wang 2008). Da MUPP1 in Hodengewebe ebenfalls einen Komplex mit der CaMKII bildet (Dissertation Frauke Ackermann, 2008), soll im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob MUPP1 auch in Spermien mit der CaMKII interagiert und welche funktionelle Rolle sowohl der CaMKII selbst als auch einem Komplex aus CaMKII und MUPP1 während der Akrosomreaktion von Säugerspermien zukommt. Darüber hinaus soll geprüft werden, ob MUPP1 möglicherweise auch an der Ausbildung der akrosomalen Synapse durch ein CAZ-ähnliches Netzwerk beteiligt sein könnte.

4 Material

4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
A23187 Calcium-Ionophor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin-Natrium-Salz	Applichem, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Autocamtide-2 inhibitory peptide II (AIP II)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Eosin G-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Eukitt Eindeckmedium für wasserfreie Präparate	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fluoreszenz-Eindeckmedium (Fluorescent Mounting Medium)	Dako Cytomation, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching (Österreich)
Formaldehydlösung, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Hämalaun-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Igepal (Nonidet P-40 alternative)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchenserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumlactat-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Para-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraffin Paraplast Plus Einbettmedium	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, 16 %	Science Services, München
Peanut Agglutinin (PNA), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Peanut Agglutinin (PNA), Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Peanut Agglutinin (PNA), Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease-Inhibitor Cocktail Set III	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitor cOmplete Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim
Protein-A magnetische Beads	Genscript, Piscataway (USA)
Protein-G magnetische Beads	Genscript, Piscataway (USA)
Roti-Blue Färbelösung	Carl Roth, Karlsruhe
Sigmacote	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptolysin-O (SLO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TO-PRO3	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Triethanolamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylol-Ersatz (Roti-Histol)	Carl Roth, Karlsruhe

Standardchemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

4.2 Puffer, Nährmedien

Puffer für die Molekularbiologie	
Probenpuffer für die Agarosegel-elektrophorese (6x) 40 % Glycerin (v/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v) in TBE-Puffer	TBE-Puffer 89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0
Puffer für die Proteinbiochemie	
Anodenpuffer I 300 mM Tris 20 % Methanol (v/v) pH 10,4 Bradford-Reagenz 5 % Bradford Stammlösung (v/v) 8,5 % Phosphorsäure (v/v) ECL-Lösung I 100 mM Tris/HCl 2,5 mM Luminol 0,4 mM Para-Coumarinsäure pH 8,5 Gel-Extraktionspuffer 2,5 % Ameisensäure (v/v) 50 % Acetonitril (v/v) Gel-Waschlösung B 50mM NH_4HCO_3 50 % Acetonitril (v/v) Glutathion-Elutionspuffer 50 mM Tris/HCl 10 mM Glutathion pH 8,0	Anodenpuffer II 25 mM Tris 20 % Methanol (v/v) pH 10,4 Bradford-Stammlösung 0,1 % Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v) in Ethanol ECL-Lösung II 100 mM Tris/HCl 18 μM H_2O_2 pH 8,5 Gel-Waschlösung A 50mM NH_4HCO_3 Gewebefixierungslösung für die EM 1,25 % Paraformaldehyd (v/v) 0,5 % Glutaraldehyd (v/v) 0,025 % Picrinsäure (v/v) in 0,1 M Natriumkakodylat in H_2O pH 7,3 Harnstoffpuffer 4 M Harnstoff 5 mM Tris 2 mM EGTA pH 9,5

Puffer für die Proteinbiochemie	
HEPES-Resuspensionspuffer 50 mM HEPES 250 mM NaCl 1 mM CaCl_2 0,5 % Igepal (v/v) pH 7,6	Homogenisationspuffer für Hoden 10 mM Tris/HCl 3 mM MgCl_2 2 mM EDTA pH 7,4
Homogenisationspuffer für Spermien 50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 2 mM EGTA 0,5 % Igepal (v/v) 0,1 mM PMSF pH 8,0	Kathodenpuffer 40 mM 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v) pH 7,6
Kolloidale Coomassie-Färbelösung 20 % Methanol (v/v) 10 % Phosphorsäure (v/v) 10 % Ammoniumsulfat (w/v) 0,12 % Coomassie G-250 (w/v)	Modifizierter RIPA-Puffer 150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 2 mM EGTA pH 8,0
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) 150 mM NaCl 1,4 mM K_2HPO_4 8 mM Na_2HPO_4 pH 7,4	Ponceau S Lösung 0,1 % Ponceau S (v/v) 5 % Essigsäure (v/v)
Probenelutionspuffer für die MS (2x) 120 mM Tris/HCl 20 % Glycerin (v/v) 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) 8 % SDS (w/v) 0,01 % Bromphenolblau (w/v) pH 6,8	Probenpuffer für die SDS-PAGE (4x) 62,5 mM Tris/HCl 20 % Glycerin (v/v) 5 % β -Mercaptoethanol (v/v) 4 % SDS (w/v) 0,1 % Bromphenolblau (w/v) pH 6,8
Sammelgelpuffer (4x) 500 mM Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 6,8	SDS-Laufpuffer 25 mM Tris 0,1 % SDS (w/v) 190 mM Glycin
Stripping-Puffer 50 mM Tris/HCl 2 % SDS pH 6,8 100 mM β -Mercaptoethanol (vor Gebrauch frisch hinzufügen)	Sukrosepuffer 300 mM Sukrose 100 mM Tris/HCl pH 7,4

Puffer für die Proteinbiochemie	
Tris gepufferte Salzlösung (TBS) 0,1 M Tris/HCl pH 7,3	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST) 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 (v/v) pH 7,4
Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8	Überschichtungspuffer 25 % Sammelgelpuffer (4x) (v/v) 50 % Isopropanol (v/v) 25 % H ₂ O (v/v)
Zitratpuffer 100 mM Natriumzitat 100 mM Zitronensäure	
Puffer für reproduktionsbiologische Techniken	
Coomassiefärbelösung für Spermien 50 % Methanol (v/v) 10 % Essigsäure (v/v) 0,04 % Coomassie Brilliant Blau G250(w/v) 40 % H ₂ O (v/v)	DTT-Puffer 250 mM Sukrose 20 mM HEPES 2 mM DTT 0,5 mM EGTA pH 7,0
Fixierungslösung für Spermien 20 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl 7,5 % Formaldehydlösung (v/v)	HB-Puffer 150 mM NaCl 25 mM Triethanolamin 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ pH 8,5
HS-Puffer HS-Stammlösung 1:2 supplementiert mit 5 mM Glukose 30 mM HEPES 10 mM Natriumlactat 1 mM Natriumpyruvat pH 7,4	HS-Stammlösung 270 mM NaCl 10 mM KCl 2 mM MgSO ₄ 4 mM CaCl ₂

Puffer für reproduktionsbiologische Techniken

Kapazitationspuffer

HS-Puffer supplementiert mit
 15 mM NaHCO₃
 0,5 % BSA (w/v)

Postfixierungswaschpuffer

100 mM Ammoniumacetat
 pH 9,0

Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung (KRB)

5,6 mM Glukose
 0,55 mM Natriumpyruvat
 25 mM Na₂HCO₃
 53 mM Natriumlactat
 99,6 mM NaCl
 4,8 mM KCl
 1,2 mM K₂HPO₄
 1,2 mM MgSO₄
 pH 7,4

Puffer und Nährmedien für Bakterien

FSP-Puffer

10 mM KAc
 45 mM MnCl₂
 10 mM CaCl₂
 100 mM KCl
 3 mM Co(NH₃)₆Cl₃
 10 % Glycerol (v/v)
 pH 6,4
 steril filtriert

LB-Agar

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 20 g Agar
 ad 1 l H₂O, autoklaviert

LB-Medium

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g Natriumchlorid
 ad 1 l H₂O, autoklaviert

Glycerin-Einfrierlösung

65 % Glycerin
 0,1 M MgSO₄
 0,025 M Tris
 pH 9,5
 steril filtriert

LB/K-Medium

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 20 g Glukose
 20 mM MgSO₄
 ad 1 l dH₂O, autoklaviert

Zur Selektion wurden dem LB-Agar bzw. LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

4.3 Kits, Enzyme und Größenstandards

Artikel	Hersteller
BigDye Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Calmodulin, enthalten in P6060 (rekombinante Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA Clean and Concentrator Kit	Zymo, Irvine (USA)
DNase I	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA-Größenstandard (100 BP, 1 kBP)	Thermo Scientific, Dreieich
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Dreieich
Nucleobond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Pfu-Polymerase und -Puffer	Thermo Scientific, Dreieich
Protein-Größenstandard BluePlus	Biomol, Hamburg
Protein-Größenstandard BluePlus WIDE	Biomol, Hamburg
Protein-Größenstandard HiMark	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Protein-Größenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Dreieich
Protein-Größenstandard PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Dreieich
Protein-Größenstandard Spectra Multicolor High Range	Thermo Scientific, Dreieich
Restriktionsenzyme und -puffer	Thermo Scientific, Dreieich
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SigmaFast 3,3' Diaminobenzidin Tabletten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Taq-Polymerase und -Puffer	Thermo Scientific, Dreieich
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific, Dreieich
Trypsin, porcine, Sequencing Grade	Promega, Mannheim
Vectastain Elite ABC Kit Standard	Vector Labs, Burlingame (USA)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo, Irvine (USA)

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

Name	Donor- spezies	Verdünnung		Herkunft	Katalog- nummer
		ICC/IHC	WB		
Bassoon	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	141 003
CaMKII α	Maus	-	1:1.000	Becton Dickinson, Heidelberg	611 292
Caveolin-1	Kaninchen	-	1:2.000	Santa Cruz, Heidelberg	SC894
GST *	Ziege	-	1:5.000	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)	27457701
GST *	Ziege	-	1:5.000	Genscript, Piscataway (USA)	01380200
Munc13-N _{abc}	Kaninchen	1:100	1:2.000	Abcam, Cambridge (UK)	ab27077
Munc13-N _{sysy}	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	126 102
Munc13-C	Ziege	-	1:2.000	Abcam, Cambridge (UK)	ab27102
Munc18-1	Kaninchen	-	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	116 002
MUPP1	Maus	-	1:500	Becton Dickinson, Heidelberg	661558
p-CaMKII α	Maus	-	1:500	Santa Cruz, Heidelberg	32289
Piccolo	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	142 003
RIM1	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	140 023
RIM1/2 ZNF	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	140 203
RIM2 PDZ	Kaninchen	1:100	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	140 103
RIM2	Kaninchen	-	1:2.000	Synaptic Systems, Göttingen	140 303
RIM-BP3	Kaninchen	-	1:5.000	Prof. Guoliang Xu, Chinese Academy of Sciences, Shanghai (China)	-

* Primärantikörper ist Peroxidase-gekoppelt.

4.4.2 Sekundärantikörper

Name	Donorspezies	Verdünnung		Hersteller
		ICC/IHC	WB	
anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:500	-	Vector Labs, Burlingame (USA)
anti-Kaninchen IgG, Gold-gekoppelt (5 nm)	Ziege	1:100	-	BB International, Cardiff (UK)
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt	Ziege	-	1:7.500	Bio-Rad, München
anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Ziege	-	1:10.000	Bio-Rad, München
anti-Ziege IgG, biotinyliert	Pferd	1:500	-	Vector Labs, Burlingame (USA)
anti-Ziege IgG, Peroxidase-gekoppelt	Esel	-	1:5.000	Santa Cruz, Heidelberg

4.5 Primer

Name	Sequenz	Enzym-Schnittstelle
β -Aktin fw	5' GGCTACAGCTTCACCACCAC 3'	-
β -Aktin rev	5' GAGTACTTGGCGTCAGGAGG 3'	-
pGEX fw	5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'	-
pGEX rev	5' CCGGGAGCTGCATGTGTCTCAGAGG 3'	-
RIM2-ZNF fw	5' GCGGGATCCATGTCGGCTCCGCTCGG 3'	BamHI
RIM2-ZNF rev	5' GCGGAATTCTCACTCAACTGCAGGTAAGTAT 3'	EcoRI
RIM2-PDZ fw	5' GCGGGATCCATGCGCCAGGTTTCACTGAG 3'	BamHI
RIM2-PDZ rev	5' GCGAAGCTTTTACATGCCAGGACTCATGGG 3'	HindIII
RIM2-C2A fw	5' GCGGGATCCCCCATGAGTCCTGGCATG 3'	BamHI
RIM2-C2A rev	5' GCGAAGCTTTTCAACTTATTCTCTTCGACCTTTG 3'	HindIII
RIM2-PRR fw	5' GCGGAATTCTGCAAAGGTCGAAGAGAATAAGTG 3'	EcoRI
RIM2-PRR rev	5' GCGAAGCTTTTACAGGCGGACCCCAAG 3'	HindIII
RIM2-C2B fw	5' GCGGGATCCCCTGGGGTCCGCCTG 3'	BamHI
RIM2-C2B rev	5' GCGAAGCTTTTCATGAACGAGAGTAAGAAGGTCC 3'	HindIII

Die verwendeten vorwärts (fw) und rückwärts (rev) Primer wurden von Life Technologies Custom Primers (Carlsbad, USA) oder Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

4.6 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) BL21	PD Dr. Jürgen Krieger, Universität Hohenheim
<i>E. coli</i> DH5 α	PD Dr. Jürgen Krieger, Universität Hohenheim

Plasmid	Spezies der Insert-DNA	AS-Sequenz des Inserts	Herkunft
pGEX2T	-	-	Prof. Dr. Michael Bölker, Universität Marburg
pGEX2T1	-	-	Prof. Dr. Susanne Schoch, Universität Bonn
pGEX MUPP1 PDZ1-3	Ratte	AS 118 - 504	Prof. Ronald T. Javier, Baylor College of Medicine, Houston (USA)
pGEX MUPP1 PDZ4-5	Ratte	AS 489 - 785	Prof. Ronald T. Javier, Baylor College of Medicine, Houston (USA)
pGEX MUPP1 PDZ6-9	Ratte	AS 780 - 1611	Prof. Ronald T. Javier, Baylor College of Medicine, Houston (USA)
pGEX MUPP1 PDZ10-11	Ratte	AS 1606 - 1830	Prof. Ronald T. Javier, Baylor College of Medicine, Houston (USA)
pGEX MUPP1 PDZ12-13	Ratte	AS 1825 - 2054	Prof. Ronald T. Javier, Baylor College of Medicine, Houston (USA)
pGEX RIM2 ZF+IR	Ratte	AS 1 - 466	Prof. Dr. Susanne Schoch, Universität Bonn
pGEX RIM2 PDZ+C2A	Ratte	AS 455 - 969	Prof. Dr. Susanne Schoch, Universität Bonn
pGEX RIM2 ZF	Maus	AS 1 - 202	in der vorliegenden Arbeit kloniert, s. Abschnitt 5.1
pGEX RIM2 PDZ	Maus	AS 507 - 766	in der vorliegenden Arbeit kloniert, s. Abschnitt 5.1
pGEX RIM2 C2A	Maus	AS 761 - 937	in der vorliegenden Arbeit kloniert, s. Abschnitt 5.1
pGEX RIM2 PRR	Maus	AS 931 - 1368	in der vorliegenden Arbeit kloniert, s. Abschnitt 5.1
pGEX RIM2 C2B	Maus	AS 1364 - 1550	in der vorliegenden Arbeit kloniert, s. Abschnitt 5.1

4.7 Gebrauchswaren

Artikel	Hersteller
Acclaim PepMap100, C18, 100µm x 2cm, 5µm	Thermo Scientific, Dreieich
Acclaim PepMap capillary column nano viper, C18, 75µm x 25cm, 2µm	Thermo Scientific, Dreieich
Allgemeine Glaswaren	Carl Roth, Karlsruhe VWR, Darmstadt
Amicon Ultra 0,5 ml, 30 kDa Ausschlussfilter	Merck Millipore, Schwalbach
Deckgläschen (24 x 60 mm)	Menzel, Braunschweig
Dounce-Homogenisator	Kontes, Vineland (USA)
Elektrodenpapier NovaBlot	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Färbekasten und -gestell aus Glas	Carl Roth, Karlsruhe
Fettstift (Pap Pen)	Dako Cytomation, Hamburg
Inkjet-F Einmalspritzen (1 mL)	Braun, Melsungen
Mikroliterspritzen Gastight (1705, 1710)	Hamilton, Bonaduz (Schweiz)
Mörser mit Pistill	Carl Roth, Karlsruhe
Neubauer-Improved Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrozellulose-Membran Protran 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Novex NuPage SDS-PAGE System, 3-8 % Tris-Acetat-Gradientengele	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Novex NuPage SDS-PAGE System, 4-12 % Bis-Tris Gradientengele	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger, beschichtet (Super Frost Plus)	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
PE-Schlauchfolie (0,2 mm)	Rische und Herfurth, Hamburg
Petrischalen (Ø 35 mm, 60 mm, 100 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Indikatorpapier	Macherey-Nagel, Düren
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen für Multipette Combitip (0,2 - 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Potter Elvehjem (3 ml, 30 ml)	VWR, Darmstadt
Potter Elvehjem (17 ml)	Omnilab, Bremen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Einmal-Injektionskanüle Gr. 18	Braun, Melsungen

4.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese-System	Peqlab, Erlangen
Bakterieninkubator T6030	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttelinkubator SHKE 6000	Thermo Scientific, Dreieich
Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Chemilumineszenz-Detektionssystem (Chemismart 5100)	Peqlab, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop IX71 mit Lichtquelle X-Cite 120PC und Kamera XM10	Olympus, Hamburg
Gewebeeinbettssystem EG 1150	Leica Microsystems, Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020	Leica Microsystems, Wetzlar
Immunoblot-Apparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Inkubator HeraCell 240	Thermo Scientific, Dreieich
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss, Jena
Kühlplatte für die Histologie (EG 1150C)	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifugen (Biofuge Stratos, Biofuge Fresco 21)	Thermo Scientific, Dreieich
Lichtmikroskop CKX41 mit Kamera SC20	Olympus, Hamburg
LTQ Orbitrap Velos Pro	Thermo Scientific, Dreieich
Magnetrührer (Barnstead Thermolyne)	Thermo Scientific, Dreieich
Mikrowelle	Severin, Sundern
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Scientific, Dreieich
PCR-Maschine	Bio-Rad, München
PCR-Maschine Primus 25	Peqlab, Erlangen
pH-Meter FiveEasy (FE 20)	Mettler-Toledo, Gießen
PicoTipEmitter, 30µm	New Objective, Woburn (USA)
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Rotationsmikrotom RM 2125RT	Leica Microsystems, Wetzlar
Schüttelheizblock TS-100	Peqlab, Erlangen
SDS-PAGE-System Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München
Spannungsquelle EV 231	Peqlab, Erlangen
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Tiefkühlschrank -80°C	New Brunswick Scientific (Eppendorf), Hamburg
Tischzentrifuge (Biofuge Pico 17)	Thermo Scientific, Dreieich
Ultimate 3000 RSLC nano UHPLC-system (<i>online nanoflow LC-HR-MS/MS</i>)	Thermo Scientific, Dreieich
Ultraschallstab MSE 100W	Measuring + Scientific Equipment, London (UK)

Gerät	Hersteller
Ultrazentrifuge (UZ) Beckmann XL-90	Beckmann-Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugenrotoren 50 Ti und 50.2 Ti	Beckmann-Coulter, Krefeld
UV-Geldokumentationssystem Infinity 3026	Peqlab, Erlangen
Vortexer MS3 Basic	Ika, Staufen
Waage EG 620-3NM	Kern, Balingen
Wärmeschrank UFE 600	Memmert, Schwabach
Wasserbad WNE 14	Memmert, Schwabach
Wasserbad für die Histologie HI 1210	Leica Microsystems, Wetzlar
Wipp-Mischer SLG	Süd-Laborbedarf, Gauting
Überkopffrotor	Feinmechanikwerkstatt des Walther-Straub-Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München

4.9 Versuchstiere

Spezies, Stamm	Herkunft
<i>Mus musculus</i> , Balb/C	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
<i>Mus musculus</i> , C57BL/6	Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU
<i>Rattus norvegicus</i> , Sprague Dawley	Adolf-Butenandt-Institut für Physiologie der LMU
<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, Charles River, Sulzfeld

Gen-defiziente Mauslinien	Herkunft
RIM2 α knockout	Prof. Dr. Susanne Schoch, Universität Bonn
RIM1 α /RIM2 α double-knockout	Prof. Dr. Susanne Schoch, Universität Bonn

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Isolierung von Ribonukleinsäure aus Hodengewebe

Zur Isolierung von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Hodengewebe wurden nach zervikaler Dislokation die Hoden der Maus ohne Zeitverzug entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Gewebe in einen Mörser überführt, weiterhin mit flüssigem Stickstoff gekühlt und mit einem Pistill fein zermahlen. Aus dem Gewebepulver wurde die RNA mit Hilfe des *NucleoSpin RNA II* Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde das Gewebe zunächst lysiert, das Lysat filtriert und dann auf eine RNA-bindende Säule gegeben. Nach der Entsalzung der Säule wurde potentiell verbliebene genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) verdaut. Die RNA wurde nach mehreren Waschschritten der Säule mit 60 µl H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.1.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die RT-PCR zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) beruht auf dem Prinzip der reversen Transkription (RT) von mRNA durch eine virale reverse Transkriptase und der anschließenden Amplifikation des transkribierten cDNA Fragments durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Buell, Wickens et al. 1978).

Zur Synthese von cDNA wurde das *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Life Technologies, Carlsbad/USA) nach Herstellerangaben verwendet. Als Vorlage (*template*) diente dabei die Hoden-RNA, die wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben gewonnen wurde. Als Primer wurde ein Oligo(dT)-Primer eingesetzt, der spezifisch die polyadenylierten Enden reifer mRNA bindet. Zunächst wurden 8 µl RNA mit 8 µl H₂O, 2 µl dNTPs (10 mM) und 2 µl Oligo(dT)-Primer (50 µM) gemischt und zur Denaturierung der RNA und des Primers für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben auf 4 °C wurden sie zu gleichen Teilen mit cDNA-Synthesemix (nach Herstellerangaben angefertigt) versetzt und für 50 Minuten bei 50 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die cDNA-Synthesereaktion durch fünfminütiges Erhitzen auf 85 °C gestoppt, die Proben auf 4 °C abgekühlt und anschließend bei -20 °C gelagert.

5.1.3 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten aus cDNA des Hodens (s. 5.1.2) wurde die PCR (Saiki, Scharf et al. 1985) unter Verwendung der in Abschnitt 4.5 aufgeführten Primer durchgeführt. Dabei vervielfältigt eine thermostabile Polymerase (Taq) den Bereich einer *template*-DNA, der zwischen den vorwärts (*forward*, fw)- und rückwärts (*reverse*, rev)- Primer-Bindestellen liegt. Ein Amplifikationszyklus beinhaltet zunächst die Denaturierung der DNA bei hohen Temperaturen, damit sie in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend folgt die Anlagerung der Primer (*annealing*) bei einer Primer-abhängigen Temperatur und die Verlängerung der Primer durch den Anbau der als Substrat zugegebenen dNTPs (Elongation).

Tabelle 5.1: Temperaturbedingungen der β -Aktin-PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	} 35
<i>annealing</i>	60	1	
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	7	1
Lagerung	4	∞	

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurde eine PCR mit Primern für das β -Aktin-Gen (s. 4.5) durchgeführt. Pro Ansatz wurden folgende Volumina eingesetzt: 2,5 μ l 10-fach PCR-Puffer, 0,5 μ l dNTPs (10 mM), je 1 μ l des fw- und des rev-Primers (jeweils 10 μ M), 0,15 μ l Taq-Polymerase (5 Enzymeinheiten (U)/ μ l) und 18,85 μ l H₂O. Als Template wurde 1 μ l der cDNA zugegeben, in der Kontrollprobe wurde diese durch 1 μ l H₂O ersetzt, sodass ein Gesamtvolumen von 25 μ l resultierte. Die Temperaturbedingungen für die PCR sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Temperaturbedingungen der *Rims2*-PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min.	1
Denaturierung	95	30 Sek.	} 35
Annealing	55	40 Sek.	
Elongation	72	1,5/2/4 Min.	
Finale Elongation	72	10 Min.	1
Lagerung	4	∞	

Für die Amplifikation von spezifischen *Rims2*-DNA-Fragmenten aus cDNA des Hodens wurden die unter Abschnitt 4.5 aufgeführten Primer und eine „Korrektur lesende“ (*proofreading*) Polymerase (Pfu) verwendet. Zu je 2 μ l der cDNA als Template wurden 48 μ l Mastermix gegeben, der aus 5 μ l 10-fach PCR-Puffer, 1,5 μ l dNTPs (10 mM), je

1,5 µl des fw- und des rev-Primers (jeweils 10 µM), 1 µl Pfu-Polymerase (2,5 U/µl) und 37,5 µl H₂O bestand. Die Elongationszeiten variierten zwischen den verschieden langen zu amplifizierenden Fragmenten: bei dem RIM2-ZNF Amplifikat betrug sie 1,5 Minuten, bei den Fragmenten RIM2-PDZ, RIM2-C2A und RIM2-C2B zwei Minuten und bei RIM2-PRR vier Minuten. Die Temperaturbedingungen für die PCR sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

5.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese beruht darauf, dass Nukleinsäuremoleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode wandern (Aaij und Borst 1972). Ihr Molekulargewicht bestimmt in einer Agarosegelmatrix die Geschwindigkeit der Bewegung, weswegen sie so der Größe nach aufgetrennt werden können (Aaij und Borst 1972). Durch die Zugabe von DNA-interkalierenden Farbstoffen wie z. B. Ethidiumbromid, das nach der Bindung an DNA mit ultraviolettem (UV) Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann (Le Pecq und Paoletti 1966), können so DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden (Sharp, Sugden et al. 1973).

Für die Auftrennung der PCR-Produkte (s. Abschnitt 5.1.3) in einem 1 %-igen Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (s. 4.2) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml zugesetzt und die gelöste Agarose in einen mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekommer platziert und der Kamm entfernt. Die PCR-Produkte wurden mit Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese (s. 4.2) versetzt und in die durch den Kamm entstandenen Taschen gegeben. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenstandard auf eine separate Gelspur aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 40 Minuten bei einer konstanten Spannung von 120 V.

5.1.5 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Durch die Anregung mit UV-Licht wurden die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte sichtbar gemacht, die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde das *Zymoclean Gel DNA Recovery* Kit (Zymo, Irvine/USA) nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurde das Gelstück zunächst mit dem dreifachen Puffervolumen [ml] pro Masse [g] überschichtet, durch temperieren gelöst und auf eine DNA-bindende Säule gegeben. Nach mehreren Waschschritten der Säule wurde die DNA mit 10 µl H₂O eluiert.

5.1.6 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten und Klonierungsvektoren

Bestimmte Restriktionsendonukleasen schneiden den DNA-Doppelstrang versetzt (Hedgpeth, Goodman et al. 1972), so dass an den 5'- bzw. 3'-Enden Überhänge verbleiben (sogenannte „klebrige“ Enden), die besonders leicht mit identisch geschnittenen Fragmenten zusammengefügt (ligiert) werden können (Lehman 1974). Diese Eigenschaft macht man sich bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor zunutze (Lehman 1974).

Die Primer, die für die RIM2-PCR-Produkte verwendet wurden, enthalten spezifische Enzymschnittstellen, die im Abschnitt 4.5 aufgeführt sind. pGEX-Plasmide (s. 4.6) enthalten eine sogenannte *multiple cloning site* mit Schnittstellen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen. Der „Doppolverdau“ mit je zwei Restriktionsenzymen erfolgte bei Vektor und PCR-Produkt mit den für fw- bzw. rev-Primer der RIM2-PCR-Produkte angegebenen Enzymen. Die Volumenverhältnisse der Enzyme (10 U/µl) und der empfohlenen Puffer für die Spaltung wurden auf der Webseite des Herstellers ermittelt (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/?redirect=true>). Im einzelnen wurden 1 µl *EcoRI*, 2 µl *BamHI*, 4 µl 10-fach Tango-Puffer und 3 µl H₂O mit 10 µl des RIM2-ZNF-Eluats oder mit 10 µl des pGEX-Vektors, je 1 µl *BamHI*, 2 µl *HindIII*, 2 µl 10-fach BamHI-Puffer und 5 µl H₂O mit 10 µl des RIM2-PDZ-, des RIM2-C2A, des RIM2-C2B-Eluats oder mit 10 µl des pGEX-Vektors und je 1 µl *HindIII*, 1 µl *EcoRI*, 2 µl 10-fach R-Puffer und 6 µl H₂O mit 10 µl des RIM2-PRR-Eluats oder mit 10 µl des pGEX-Vektors gemischt und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach zwei und nach 2,5 Stunden wurde zu den Ansätzen mit pGEX-Plasmid je 1 µl *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) gegeben, die die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert und so eine Re-Ligation der beiden Enden des Vektors verhindert. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten auf 80 °C erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren und so die Reaktion zu beenden. Da die DNA in einem Proteingemisch vorlag, wurde sie mit Hilfe eines *DNA Clean and Concentrator Kits* (Zymo, Irvine, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Verhältnis von DNA-Bindepuffer und RIM2-Fragmenten betrug dabei 2:1, während der pGEX-Vektor stärker verdünnt wurde (Verhältnis Puffer/Vektor: 5/1). Das Gemisch wurde im Folgenden auf eine DNA-bindende Säule gegeben, die Säule gewaschen und die RIM2-Fragmente mit 10 µl, der Vektor mit 20 µl H₂O eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im NanoDrop Spektrophotometer bestimmt.

5.1.7 Ligation eines DNA-Fragments in ein Plasmid

Unter dem Begriff Ligation versteht man in der Molekularbiologie das Verbinden zweier DNA-Stränge, bei denen das 3'-Ende des einen mit dem 5'-Ende des anderen Stranges mit Hilfe einer DNA-Ligase verbunden wird (Lehman 1974). Um ein DNA-Fragment (*insert*) in einen Klonierungsvektor einzufügen, werden beide mit denselben Restriktionsenzymen gespalten, sodass zueinander passende klebrige Enden entstehen (s. 5.1.6). Die DNA-Stränge können sich mit ihren komplementären Basen aneinander anlagern und die DNA-Ligase (T4) katalysiert unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden (Lehman 1974).

Um eine möglichst hohe Ligationsrate zu erzielen, erfolgte die Ligation von *insert* und Vektor im molaren Verhältnis von 1:2 oder 1:3 (*insert*:Vektor). Für 100 ng Vektor-DNA wurde die erforderliche Masse *insert*-DNA mit Hilfe des *ligation calculator* (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html) berechnet. Zu einem entsprechenden Volumen von *insert*- und Vektor-DNA wurden 1 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10-fach T4-Ligase-Puffer gegeben und der Ansatz mit H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die Ligation für 1,5 Stunden bei 22 °C, bis sie durch 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt wurde.

5.1.8 Amplifikation von DNA in Bakterien

Um ein rekombinantes Plasmid zu vermehren, macht man sich die Tatsache zunutze, dass Bakterien in der Lage sind, Plasmid-DNA zu replizieren, wenn diese einen Replikationsstartpunkt enthält (Baker und Wickner 1992).

5.1.8.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Der Begriff Kompetenz beschreibt in der Mikrobiologie die Fähigkeit von Zellen, im umgebenden Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Bereits Anfang der 1970er Jahre zeigten zufällige Beobachtungen an *Escherichia coli* (*E. coli*), dass die Aufnahme von DNA-Molekülen durch eine Behandlung der Bakterien mit eisgekühlter Salzlösung wesentlich verbessert werden kann (Mandel und Higa 1970), obwohl der genaue Aufnahmemechanismus bis heute nicht vollständig verstanden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen in Anlehnung an die von Hanahan entwickelte Methode hergestellt (Hanahan 1983). Dafür wurden zunächst 100 ml LB/K Medium (s. 4.2) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert und bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) im Bakterienschüttler inkubiert, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,5 erreicht war. Dann wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 Minuten, 200 x g, 4 °C) sedimentiert, in 20 ml eisgekühltem FSP-Puffer (s. 4.2) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter

Zentrifugation (10 Minuten, 200 x g, 4 °C) wurden die Zellen in 4 ml eisgekühltem FSP-Puffer, dem 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt wurden, resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 150 µl DMSO wurden die Bakterien erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei -80 °C gelagert.

5.1.8.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Bei der Transformation werden DNA-Moleküle in kompetente Bakterien eingebracht (Oishi und Cosloy 1972). Für die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* (s. Abschnitt 5.1.8.1) wurde die Hitzschock-Methode verwendet (Inoue, Nojima et al. 1990), bei der man sich eine höhere Membranfluidität durch Wärmeeinwirkung zunutze macht. Durch ein auf dem Vektor enthaltenes Antibiotikumresistenz-Gen besitzen die Bakterien, die erfolgreich mit dem Plasmid transformiert wurden, in einem Antibiotikum-haltigen Selektionsmedium, einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transformierten Zellen.

Für die Transformation wurden 50 µl der chemisch kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (s. Abschnitt 5.1.7) oder 1 µl isolierter Plasmid-DNA (s. Abschnitt 5.1.8.3) versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden 200 µl LB-Medium (s. 4.2) hinzugefügt und die Bakterien für 40 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bevor sie auf mit Ampicillin versetzten LB-Agar-Platten (s. 4.2) ausgestrichen wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator inkubiert.

5.1.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation kleinerer Plasmid-Mengen wurde eine einzelne, auf dem Selektionsmedium gewachsene *E. coli* DH5α-Kolonie mit der Pipettenspitze aufgenommen, in 3 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (s. 4.2) überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Bakterien-schüttler inkubiert. Zur Konservierung von Klonen wurde 1 ml dieser über Nacht gewachsenen Kultur mit 0,5 ml Glycerin-Einfrierlösung (s. 4.2) versetzt und bei -80 °C eingefroren. Für folgende Kulturen wurde von diesem Stock mit einer Pipettenspitze etwas abgekratzt und zur Inokulation genutzt. Für die Isolierung von DNA in präparativem Maßstab wurden 200 µl aus der über Nacht gewachsenen Kultur entnommen und in 200 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm für weitere 8 – 12 Stunden vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C für 15 Minuten sedimentiert. Die Plasmid-DNA wurde dann entweder aus der über Nacht gewachsenen Kultur mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Scientific, Dreieich) oder aus der größeren Kultur mit Hilfe des *Nucleobond Xtra Midi Plus Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Das zugrunde liegende Prinzip ist bei beiden Kits das

Gleiche: Zunächst werden die Plasmide durch alkalische Lyse der Bakterien freigesetzt, die Bakterienüberreste durch Zentrifugation oder über einen Filter entfernt und anschließend wird die DNA an eine Säule gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird sie dann entweder mit 50 µl H₂O (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit*), oder mit 5 ml Elutionspuffer (*Nucleobond Xtra Midi Plus Kit*) von der Säule eluiert. Letztere wurde im Anschluss mit dem *Nucleobond Finalizer* konzentriert. Zur Überprüfung der amplifizierten DNA wurde diese entweder wie im folgenden Abschnitt beschrieben sequenziert oder erneut einer restriktionsenzymatischen Spaltung (s. Abschnitt 5.1.6) und anschließender Analyse mittels Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 5.1.4) unterzogen.

5.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der in pGEX-Vektoren eingefügten Inserts wurde entweder von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) mit den dort erhältlichen pGEX-Primern, oder nach einer Sequenzierungs-PCR mit Hilfe des *BigDye Sequencing Kits* (Life Technologies, Carlsbad, USA) von der LIFE & BRAIN GmbH (Bonn) durchgeführt. In beiden Fällen erfolgte die Sequenzierung in Anlehnung an die von Sanger entwickelte Nukleotid-Abbruch-Methode (Sanger, Nicklen et al. 1977).

Für die Sequenzierungs-PCR wurden je 4 µl der zu analysierenden Plasmid-DNA mit 0,5 µl BigDye Ready Reaction Mix, 1 µl entweder des pGEX fw- oder des rev-Primers (s. 4.5), 4 µl BigDye-Puffer und 10,5 µl H₂O gemischt. Die Temperaturbedingungen für die PCR sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Im Anschluss an die PCR wurde die DNA mit Hilfe des *DNA Clean and Concentrator Kits* (Zymo) nach Herstellerangaben aufgereinigt (für einen Überblick s. Abschnitt 5.1.6).

Tabelle 5.3: Temperaturbedingungen für die Sequenzierungs-PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96	1 Min.	1
Denaturierung	96	10 Sek.	} 25
Annealing	50	5 Sek.	
Elongation	60	4 Min.	
Lagerung	4	∞	

Für die Auswertung der Sequenzierung und Sequenzvergleiche wurde das Programm *BioEdit* (Ibis Biosciences, Carlsbad/USA) verwendet.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Differentielle Zentrifugation

Bei der differentiellen oder fraktionellen Zentrifugation werden Zellbestandteile aufgrund ihrer Größe und Dichte durch mehrere serielle Zentrifugationsschritte aufgetrennt (McKeel und Jarrett 1970).

5.2.1.1 Herstellung von Zytoplasmafraktionen

Um zytoplasmatische Zellfraktionen aus Hodengewebeproben und epididymalen Spermien der Ratte zu gewinnen, wurden den Tieren die Hoden nach Begasung mit CO₂ ohne Zeitverzug entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Isolierung epididymaler Spermien siehe Abschnitt 5.3.1. Die Hoden- und Spermienpräparationen wurden anschließend in ca. 10 mL pro Gramm Gewebe/Zellen mit Proteaseinhibitor versetztem Homogenisationspuffer für Hoden bzw. für Spermien (s. 4.2) aufgenommen. Unter ständiger Kühlung auf Eis wurde/n das Gewebe/die Zellen in einem Gewebehomogenisator vom Typ Potter Elvehjem homogenisiert und mit dem Ultraschallstab drei Mal für 30 Sekunden sonifiziert. Nachdem die Homogenate für 30 Minuten auf Eis gerührt worden waren, wurden die Zellnuklei und intakte Organellen in einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C sedimentiert (Präzipitat 1, P₁) und verworfen. Das Zellkern-freie Homogenat (*supernatant* 1, S₁) wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C von verbleibenden Zellresten befreit. Der Überstand (S₂), der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford (s. Abschnitt 5.2.2) bestimmt.

5.2.1.2 Herstellung von Membranfraktionen

Um Gewebeproben der Maus und der Ratte zu gewinnen, wurden das Gehirn, die Hoden und die Nebenhoden nach zervikaler Dislokation bzw. Begasung mit CO₂ ohne Zeitverzug entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Isolierung epididymaler Spermien siehe Abschnitt 5.3.1. Für die differentielle Zentrifugation wurden die Organe/Zellen auf Eis aufgetaut, gewogen und in einen Gewebehomogenisator vom Typ Potter Elvehjem gegeben. Anschließend wurden ca. 10 ml eiskühlter und mit Proteaseinhibitor versetzter Sukrosepuffer (s. 4.2) pro Gramm Gewebe/Zellen zugegeben und die Gewebe/Zellen unter ständiger Kühlung auf Eis homogenisiert. Nach der Behandlung im Homogenisator wurden die Gewebe/Zellen zusätzlich mit dem Ultraschallstab drei Mal für 30 Sekunden, ebenfalls unter ständiger Kühlung auf Eis, sonifiziert. Zellkerne und nicht-homogenisierte Gewebereste wurden

durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert und verworfen. Der Überstand (S_1) wurde dann einer Ultrazentrifugation bei 175.000 x g und 4 °C in einem 50 Ti oder 50.2 Ti Rotor unterzogen. Dabei wurde eine krude Membranfraktion (P_2), die sowohl integrale Membranproteine als auch Membran-assoziierte Proteine enthält, sedimentiert und so von zytoplasmatischen Komponenten (S_2) getrennt. Je nach Größe des Präzipitats wurde es in 200 - 2.000 µl Sukrosepuffer resuspendiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (s. Abschnitt 5.2.2) wurden die Proben mit Probenpuffer für die SDS-PAGE (s. 4.2) versetzt und, sofern möglich, mit H_2O so verdünnt, dass eine finale Proteinkonzentration von 2 mg/ml resultiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

5.2.1.3 Harnstoffextraktion von Membran-assoziierten Proteinen

Die Auftrennung von Membran-assoziierten Proteinen in der SDS-PAGE kann durch die Trennung der peripheren von den integralen Membranproteinen und Lipiden (Gonen, Donaldson et al. 2000) verbessert werden. Hierfür wurde eine Harnstoffextraktion der Membranfraktion durchgeführt.

Das wie unter Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben hergestellte Membranpräzipitat (P_2) wurde dafür nicht in Sukrosepuffer, sondern in 0,5 - 1 ml Harnstoffpuffer (s. 4.2) resuspendiert und für 15 Minuten bei RT mit Hilfe eines Magnetrührers unter ständiger Durchmischung inkubiert. Anschließend wurden die nicht gelösten Membranbestandteile durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 50.000 x g und 4 °C aus dem Gemisch sedimentiert. Der Überstand (S_3), der die mit Harnstoff extrahierten Proteine enthielt, wurde abgenommen und seine Proteinkonzentration nach Bradford (s. Abschnitt 5.2.2) bestimmt. Dann wurden die S_3 -Proben mit Probenpuffer für die SDS-PAGE (s. 4.2) versetzt und nach Möglichkeit eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

5.2.1.4 Anreicherung Detergens-unlöslicher Membranbestandteile

Membranflöschchen (*membrane rafts*) sind spezielle dynamische Regionen von Plasmamembranen, die sich durch einen besonders hohen Anteil an Cholesterin und Sphingolipiden auszeichnen und im Vergleich zu ihrer Umgebung eine geringere Membranfluidität besitzen (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002; Zitanski, Borth et al. 2010). Aufgrund ihrer Zusammensetzung sind diese Membranmikrodomänen resistent gegenüber der Extraktion in nicht-ionischen Detergenzien bei 4 °C (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002; Shogomori und Brown 2003), weswegen sie auch als Detergens-resistente Membranfraktion (DRM) bezeichnet werden. Dieser Umstand wird für ihre Anreicherung mittels fraktioneller Zentrifugation genutzt.

Zur Präzipitation der Detergens-unlöslichen Membranfraktionen wurde zunächst ein Membranpräzipitat (P_2), wie unter Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben, hergestellt. Dieses wurde anschließend nicht in Sukrosepuffer, sondern in 150 – 1.000 μ l eisgekühltem PBS (s. 4.2), versetzt mit 1 % Triton X-100 und Proteaseinhibitor (1 % Triton-PBS), resuspendiert und für 1,5 Stunden bei 4 °C in einem Überkopfroter inkubiert. Für die Trennung der Detergens-löslichen (S_{TX}) von den Triton X-100-unlöslichen (P_{TX}) Membranbestandteilen wurde das Gemisch für zwei Stunden bei 50.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die S_{TX} -Fraktion wurde anschließend abgenommen und das P_{TX} -Präzipitat in 100 – 250 μ l 1 % Triton-PBS resuspendiert. Sowohl von einem aufbewahrten Aliquot der Ausgangsmembranfraktion (P_2) als auch vom S_{TX} -Überstand und P_{TX} -Präzipitat wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (s. Abschnitt 5.2.2) bestimmt. Im Anschluss wurden die Proben mit Probenpuffer für die SDS-PAGE (s. 4.2) versetzt und mit H_2O so verdünnt, dass eine finale Proteinkonzentration von 2 mg/ml resultiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

5.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ist eine kalorimetrische Methode, die darauf beruht, dass der blaue Säurefarbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 nach der Bindung an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen seine Absorptionseigenschaften ändert (Bradford 1976). Durch die Bildung des Farbstoff-Protein-Komplexes wird vor allem die anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, was eine Absorptionszunahme bei 595 nm zur Folge hat, die spektrophotometrisch erfasst werden kann (Bradford 1976).

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Gewebefraktion wurden je 2 μ l der Probe bzw. 2 μ l eines BSA-Standards (2 mg/ml) mit H_2O auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt. Da die Anwesenheit von Detergenzien die Absorptionseigenschaften einer Lösung verändern kann, wurden bei Fraktionen, die sich in einem Detergens-haltigen Puffer befanden, sowohl der Standard- als auch der Leerwertprobe 2 μ l des entsprechenden Puffers zugesetzt. Anschließend wurden alle Proben mit 1,5 ml Bradford-Reagenz (s. 4.2) gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Bestimmung der Absorption bei 595 nm wurde die Reaktionslösung in Halbmikroküvetten überführt und zunächst der Leerwert im Spektrophotometer erfasst. Anhand der bekannten Proteinkonzentration in der Standard-Probe konnte dann die Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben berechnet werden.

5.2.3 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche Natriumlaurylsulfat- (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Anders als DNA-Moleküle besitzen Proteine einen Protein-spezifischen Anteil basischer und saurer Aminosäuren und damit eine charakteristische Nettoladung, weswegen sie zwar in einem elektrischen Feld beweglich sind, jedoch steht dies nicht im Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine deshalb durch das starke anionische Detergens SDS reduziert und besitzen so eine negative Nettoladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Außerdem werden die Proteine durch Hitze denaturiert und die Tertiärstruktur durch SDS und im Probenpuffer (s. 4.2) enthaltene Thiole zerstört, so dass die Auftrennung der Proteine in der Polyacrylamidgelmatrix ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts erfolgt.

Die Porengröße der Polyacrylamidmatrix bestimmt dabei die Geschwindigkeit der Auftrennung und ist abhängig von der zugegebenen Acrylamidkonzentration, wobei eine geringere Konzentration zu größeren Poren führt und umgekehrt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein geschichtetes System aus zwei Gelkomponenten verwendet, bei dem das untere Gel, das Trenngel, eine höhere Ionenstärke (1,5 M Tris/HCl), einen höheren pH-Wert (pH 8,8) und eine höhere Acrylamidkonzentration (4 – 13 %) aufweist, als das darüber liegende Sammelgel (0,5 M Tris/HCl; pH 6,8; 3,7 oder 5,6 % Acrylamid). Nachdem die Proteine zunächst das verhältnismäßig poröse Sammelgel durchlaufen haben, sammeln sie sich in einer schmalen Zone am Übergang zum Trenngel. Durch diese Konzentration der Proteine am Beginn der Auftrennung im Trenngel erhöht sich die Trennschärfe der Gelelektrophorese.

Tabelle 5.4: Acrylamidkonzentrationen von Trenn- und Sammelgel bei verschiedenen molekularen Massen des darzustellenden Proteins.

Molekulargewicht des Proteins	Acrylamidanteil im Trenngel [%]	Acrylamidanteil im Sammelgel [%]
bis 30 kDa	13	} 5,6
30 – 60 kDa	10	
60 – 100 kDa	8	
100 – 180 kDa	7	} 3,7
180 – 250 kDa	6	
250 – 300 kDa	5	
> 300 kDa	4	

Für die Darstellung von Proteinen verschiedenen Molekulargewichtes wurden die in Tabelle 5.4 aufgeführten Acrylamidkonzentrationen in Trenn- und Sammelgel verwendet. Im Einzelnen wurde für ein Trenngel ein entsprechendes Volumen der

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese 30) und 1,35 ml Trenngelpuffer (s. 4.2) mit H₂O auf ein Volumen von 5,4 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Polymerisation durch die Zugabe von 36 µl 10 %iger Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 7,2 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) eingeleitet, das Gemisch ohne Zeitverzögerung zwischen zwei in die Gieß-Apparatur eingespannte Glasplatten gegossen und mit Überschichtungspuffer (s. 4.2) überschichtet. Das Sammelgelgemisch enthielt ein dem Acrylamidanteil im Sammelgel entsprechendes Volumen der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung und 0,9 ml Sammelgelpuffer (s. 4.2); mit H₂O wurde das Gemisch auf ein Volumen von 3,8 ml aufgefüllt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Überschichtungspuffer sorgfältig entfernt und das Sammelgelgemisch mit 36 µl APS-Lösung und 7,2 µl TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die SDS-PAGE-Apparatur eingespannt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer (s. 4.2) gefüllt. Die mit Probenpuffer versetzten Proben wurden in der Zwischenzeit auf Eis aufgetaut und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Je nach Versuchsansatz wurde das Gel mit 5 bis 100 µg Protein und einem Größenstandard (s. 4.3) in einer separaten Spur beladen und die Proteine für 30 bis 60 Minuten bei einer konstanten Spannung von 80 V fokussiert. Die anschließende Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V.

5.2.4 Immunoblot-Technik

Die Immunoblot- oder Westernblot-Technik verbindet die Größenauftrennung der SDS-PAGE mit dem spezifischen Nachweis eines Proteins durch eine Antikörper-Antigen-Bindung. Dabei werden die im Gel befindlichen Proteine zunächst in einem elektrischen Feld auf eine Trägermatrix transferiert, wo sie dem immunologischen Nachweis mit Antikörpern zugänglich sind (Towbin, Staehelin et al. 1979).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine mit Hilfe des *Semi-Dry* Transfervorgangs auf Nitrozellulosemembranen transferiert, wobei Gel und Membran „Sandwich-artig“ von Filterpapieren umgeben zwischen zwei Elektroden gestapelt wurden. Da die Filterpapiere zuvor in Puffern getränkt worden waren, bildeten sie eine leitende Verbindung zu den beiden Elektroden und dienten gleichzeitig als Ionenreservoir. Es wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem die Membran und drei Filterpapiere in Anodenpuffer II (s. 4.2) eingelegt wurden und zusammen mit weiteren sechs in Anodenpuffer I (s. 4.2) getränkten Filterpapieren die Verbindung zur Anode bildeten, während neun in Kathodenpuffer (s. 4.2) eingelegte Filterpapiere das Gel mit der Kathode verbunden haben (Abbildung 5.1). Für den Übertragungsvorgang wurde je nach Porengröße des Acrylamidgels und Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins 30 Minuten bis 15 Stunden eine Spannung von 0,8 mA/cm² Gel angelegt.

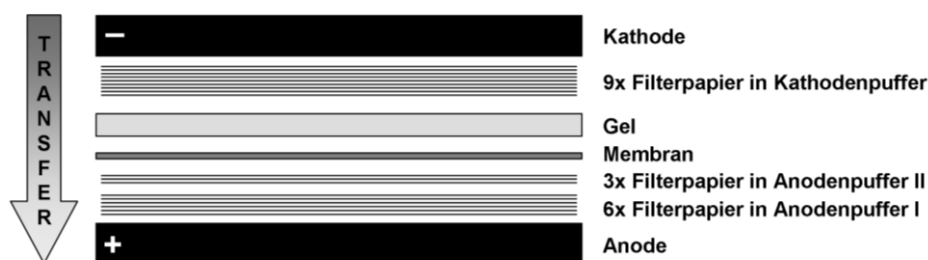


Abbildung 5.1: Schematische Übersicht über die Schichtung des *Semi-Dry* Transfersystems.

Abbildung aus Diplomarbeit Nele Zitranski, 2008.

Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran wurde diese für wenige Minuten in Ponceau S Lösung gefärbt (Rice und Hammer 1969), die Spuren und die Banden des Proteinstandards mit Bleistift markiert und die Membran durch zweimaliges Waschen für 10 Minuten mit TBST (s. 4.2) wieder entfärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran dann entweder in mit 5 % Milchpulver (MP) oder mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) versetztem TBST für 30 Minuten auf einem Taumler inkubiert. Der zum Nachweis eines Proteins genutzte spezifische Primärantikörper wurde entsprechend der unter Abschnitt 4.4.1 angegebenen Verdünnungen in mit 3 % MP bzw. mit 1 % BSA versetztem TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiger Antikörper durch drei je 10-minütige Waschschrte mit TBST entfernt. Sofern der eingesetzte Primärantikörper direkt Peroxidase-gekoppelt war (s. 4.4.1), schloss sich nun die Detektion an (s. u.). Für alle nicht direkt Enzym-konjugierten Primärantikörper erfolgte an dieser Stelle die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet, für eine Stunde bei RT auf dem Taumler. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte wie in Abschnitt 4.4.2 angegeben in mit 3 % MP bzw. mit 1 % BSA versetztem TBST. Nachdem die Membran erneut drei Mal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen worden war, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, erfolgte die Detektion der Antikörperbindung mit Hilfe des Chemilumineszenz-Verfahrens. Dabei setzt die an den Antikörper gebundene Peroxidase das Substrat Luminol mit Hilfe des Oxidationsmittels H₂O₂ unter Freisetzung von Lichtquanten um. Diese können dann entweder einen Film belichten oder mit einer Kamera aufgenommen werden. Für die Detektion wurden die ECL-Lösungen I und II (s. 4.2) zu gleichen Teilen gemischt und die Membran damit inkubiert. Nach einer Minute wurde die Membran zwischen die beiden Schichten der PE-Schlauchfolie für WB gegeben und Luftblasen entfernt. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektionssystems *Chemismart* (Peglab, Erlangen).

Um die einmal mit einem Antikörper inkubierte und entwickelte Nitrozellulosemembran erneut einer Antikörper-Detektion auszusetzen, müssen die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden (*stripping*). Dafür wurde die Membran unter ständiger Bewegung für 45 Minuten in Stripping-Puffer bei 65 °C

inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen, wie oben beschrieben blockiert und die Proteine mit einem weiteren Antikörper detektiert.

5.2.5 *In vitro* Bindungsstudien

Zum Nachweis potentieller Protein-Protein-Interaktionen wurden *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt, die entweder auf der Bindung eines endogenen Proteins aus einem Gewebe- oder Zellhomogenat an ein heterolog exprimiertes Fusionsprotein (Kaelin, Pallas et al. 1991) (*GST pull down*, s. Abschnitt 5.2.5.1) oder auf der Bindung eines endogenen Proteins im Komplex mit seinem/n Bindungspartner/n an einen Antikörper (Barrett, Wood et al. 1960) (Co-Immunpräzipitation, s. Abschnitt 5.2.5.3) basieren. In beiden Fällen folgt eine affinitätschromatografische Anreicherung der gebundenen Proteine mit ihren potentiellen Interaktionspartnern. Im Anschluss daran können die Interaktionspartner z. B. im Immunoblot oder in massenspektrometrischen Analysen nachgewiesen werden (Kaelin, Pallas et al. 1991; Kaboord und Perr 2008; Fujiwara, Uemura et al. 2014).

5.2.5.1 Expression und Aufreinigung von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen

Das pGEX-Plasmidsystem ist nicht nur gut geeignet, um Plasmid-DNA in *E. coli*-Bakterien zu vermehren (Baker und Wickner 1992), sondern auch, um die darauf kodierte Proteine zu exprimieren (Smith und Johnson 1988). pGEX-Vektoren enthalten das *lac*-Promotorsystem, das durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) aktiviert werden kann und anschließend die Proteinbiosynthese induziert. Das auf dem pGEX-Vektor kodierte Glutathion S-Transferase (GST)-Gen aus *Schistosoma japonicum* befindet sich direkt *upstream* der *multiple cloning site*, die zum Einfügen des *inserts* genutzt wurde (s. Abschnitt 5.1.7). Dadurch wird das *insert* als Fusionsprotein mit einem N-Terminalen GST-Tag exprimiert und kann so mit Hilfe einer affinitätschromatografischen Säule aus dem Zytosol der Bakterien aufgereinigt werden (Smith und Johnson 1988). Dabei bindet das GST-Tag des Fusionsproteins an das Glutathion des Säulenmaterials und kann anschließend mit einem Glutathionhaltigen Puffer durch kompetitive Verdrängung eluiert werden.

Für die Expression der GST-Fusionsproteine wurden *E. coli* BL21-Bakterien zunächst wie unter Abschnitt 5.1.8.2 beschrieben, transformiert. Anschließend wurden 3 ml mit Ampicillin supplementiertes LB-Medium (s. 4.2) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Konservierung von Klonen wurde 1 ml dieser über Nacht gewachsenen Kultur mit 0,5 ml Glycerin-Einfrierlösung (s. 4.2) versetzt und bei -80 °C eingefroren. Für folgende Kulturen wurde von diesem Stock mit einer Pipettenspitze etwas abgekratzt und zur Inokulation genutzt. Aus der

über Nacht gewachsenen Kultur wurden 200 µl entnommen, in 200 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium überimpft und für ca. drei Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,5 erreicht war. Durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM wurde die Proteinbiosynthese der Fusionsproteine induziert und die Bakterien für weitere drei bis vier Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 7.700 x g und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Präzipitate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Aufreinigung der exprimierten GST-Fusionsproteine aus dem Bakterienpräzipitat wurde dies zunächst in 10 ml eisgekühltem PBS (s. 4.2) aufgenommen, das mit 1 % Triton X-100 und 2,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt war. Zur Lyse wurde die Suspension drei Mal für je 30 Sekunden unter ständiger Kühlung auf Eis mit dem Ultraschallstab sonifiziert und anschließend für eine Stunde in ständiger Bewegung inkubiert. Nicht lysierte Bakterien, Zellkerne und Organellen wurden durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert und verworfen, während der Überstand mit 200 µl Glutathion Sepharose 4B-Suspension für 1,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert wurde. Zuvor war die Sepharose nach Herstellerangaben (GE Healthcare, Buckinghamshire/UK) gewaschen und in eine 50 %ige Suspension in PBS überführt worden. Nach der Bindung der Fusionsproteine wurde die Säulenmatrix durch Zentrifugation (1.000 x g, 5 Minuten, 4 °C) sedimentiert und in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Zur Elution wurde die Sepharose in 250 µl Glutathion-Elutionspuffer (s. 4.2) aufgenommen und für 10 Minuten bei RT unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 2.000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, auf Eis aufbewahrt und die Elution noch zwei Mal wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und zum Entfernen des Glutathion-Überschusses und zur stärkeren Konzentrierung der Proteinlösung in einen 30 kDa Ausschlussfilter gegeben und für 7 bis 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Filterröhrchen wurde anschließend mit 250 µl PBS aufgefüllt und der Vorgang zwei weitere Male wiederholt, bevor der Filter umgekehrt in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt und die Proteinlösung durch einminütige Zentrifugation (1.000 x g, 4 °C) hierin überführt wurde. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (s. Abschnitt 5.2.2) ermittelt, die eluierten Proteine in einem Immunoblot (s. Abschnitt 5.2.4) mit einem anti-GST-Antikörper (s. 4.4.1) überprüft und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.5.2 *In vitro* Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine (s. Abschnitt 5.2.5.1) können für *in vitro* Interaktionsstudien mit endogenen Proteinen in einem sogenannten *GST pull down* eingesetzt werden.

Für *in vitro* Bindungsstudien mit Membran-ständigen und Membran-assoziierten Proteinen wurde aus einem Gewebe- oder Zellhomogenat zunächst eine grobe Membranfraktion (P_2), wie unter Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben, isoliert. Das Präzipitat wurde anschließend in 2 bis 4 ml modifiziertem RIPA-Puffer (s. 4.2), versetzt mit entweder 1 % Igepal und 0,2 % SDS oder mit 0,1 % SDS und 0,5 % Natriumdesoxycholat, mit Hilfe einer Einmalspritze mit brauner Kanüle in eine sehr feine Suspension gebracht. Nachdem diese für 30 bis 60 Minuten auf Eis gerührt wurde, wurde sie für eine Stunde bei 50.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das nicht gelöste Sediment wurde verworfen und die Proteinkonzentration im löslichen Überstand bestimmt (s. Abschnitt 5.2.2). Für die Interaktionsstudien wurde ein entsprechendes Volumen des Lysats mit einem Proteingehalt von 0,5 bis 1 mg eingesetzt und mit gleichen Stoffmengen der Fusionsproteine versetzt über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Parallel wurden pro Ansatz 25 µl Säulenvolumen der Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in einem 10-fachen Volumen PBS gewaschen, dabei für fünf Minuten bei 1.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Sepharose in 100 µl mit 10 % FCS versetztem PBS (s. 4.2) ebenfalls über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Sepharose erneut gewaschen und zu gleichen Teilen in PBS aufgenommen, sodass eine 50 %ige Suspension entstand. Das mit GST-Fusionsproteinen versetzte Gewebe- oder Zellysats wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C geklärt, bevor es mit 50 µl der 50 %igen Sepharose-Suspension pro Ansatz versetzt und für 1,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert wurde.

Bei den *in vitro* Bindungsstudien von GST-Fusionsproteinen und zytosolischen Proteinen erfolgte zunächst die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Säulenmatrix. Dafür wurden pro Ansatz 25 µl Säulenvolumen der Glutathion Sepharose mit PBS wie oben beschrieben gewaschen und je 75 µg der GST-Fusionsproteine zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose drei Mal mit PBS wie oben beschrieben gewaschen und in 100 µl mit 10 % BSA versetztem PBS zur Absättigung unspezifischer Bindestellen bei 4 °C für eine Stunde rotierend inkubiert. Im Anschluss erfolgten drei weitere Waschschrte zur Entfernung der überschüssigen Blockierungslösung. Parallel zur Vorbereitung der Sepharose erfolgte die Herstellung der Zytoplasmafraktionen wie unter Abschnitt 5.2.1.1 beschrieben. Um zu untersuchen, ob die Bindung der CaMKII α an MUPP1 abhängig vom Aktivierungszustand der Kinase ist, wurde eine Hälfte des Hodenlysats in Homogenisationspuffer hergestellt, der mit 50 µM des *autocamtide-2 inhibitory*

peptide II (AIP_{II}) versetzt war. Für die Bindung der Interaktionspartner aus dem Gewebe- bzw. Zelllysate an die mit GST-Fusionsproteinen beschichtete Säulenmatrix wurde ein Volumen des Homogenats, das einem Proteingehalt von 0,5 bis 1 mg entsprach, mit der Säulenmatrix über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert.

Zur Vorbereitung auf die Detektion potentieller Bindungspartner wurden alle Ansätze vier Mal mit PBS gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine und ihrer Bindungspartner von der Sepharosematrix erfolgte durch fünfminütiges Erhitzen (95 °C) in 30 µl Probenpuffer für die SDS-PAGE (2x) (s. 4.2). Die Sepharose wurde dann durch eine einminütige Zentrifugation bei 13.000 x g sedimentiert und der Überstand der Proben in der SDS-PAGE (s. Abschnitt 5.2.3) aufgetrennt und potentielle Bindungspartner im Immunoblot (s. Abschnitt 5.2.4) detektiert. Zusätzlich wurde ein Aliquot jedes Überstands in einem separaten Kontroll-Immunoblot mit einem anti-GST-Antikörper überprüft.

5.2.5.3 (Co-)Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation beruht auf einer Antigen-Antikörperbindung, bei der das endogene Antigen in einem Gewebe- oder Zellhomogenat vorliegt und von einem zugegebenen spezifischen Antikörper gebunden wird (Kaboord und Perr 2008). Der F_c-Teil des Antikörpers kann anschließend an eine Protein-A oder -G gekoppelte Säulenmatrix binden und der Antigen-Antikörperkomplex so aus dem Gemisch affinitätschromatografisch isoliert werden (Kaboord und Perr 2008). Die Trennung von Säulenmatrix und Durchfluss erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Magneten, da magnetische Beads (Genscript, Piscataway, USA) als Säulenmatrix verwendet wurden.

Das für die Immunpräzipitation eingesetzte Gewebehomogenat wurde als Solubilisat des Gesamtgewebes hergestellt, das zuvor nicht durch differentielle Zentrifugation fraktioniert wurde. Dafür wurden die Organe direkt nach ihrer Entnahme gewogen und in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser überführt. Das gefrorene Material wurde dann weiterhin mit flüssigem Stickstoff gekühlt und mit einem Pistill zermahlen. Das Pulver wurde anschließend in einen Gewebehomogenisator vom Typ Potter Elvehjem überführt und in 10 ml mit Proteaseinhibitor versetztem HEPES-Resuspensionspuffer (s. 4.2) pro Gramm Gewebe aufgenommen. Nachdem 30 µg/ml RNase A zugegeben wurden, wurde das Gemisch unter ständiger Kühlung auf Eis homogenisiert. Zur Unterstützung der Lyse wurden 0,1 % Natriumdesoxycholat und 1 mM EDTA zugesetzt und das Gemisch für 45 bis 60 Minuten auf Eis gerührt. Nach erneuter Homogenisation wurde das Gemisch für 45 Minuten bei 100.000 x g in einem 50.2 Ti Rotor ultrazentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet. Ein Aliquot wurde außerdem als Kontrolle aufbewahrt.

Parallel zur Gewebeaufarbeitung erfolgte die Vorbereitung der Säulenmatrix unter ständiger Kühlung auf Eis. Dafür wurden zunächst 200 µl Protein-A oder Protein-G

magnetische Beads in ein Reaktionsgefäß gegeben, im Magneten separiert und überschüssige Lösung abgenommen. Anschließend wurden die Beads in 1 ml Waschpuffer (HEPES-Resuspensionspuffer versetzt mit 0,01 % Natriumdesoxycholat und Proteaseinhibitor) resuspendiert, im Magneten separiert und der Überstand verworfen. Nachdem der Waschvorgang wiederholt worden war, wurden die Beads in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. In das eine wurden 5 µg eines spezifischen Antikörpers, in das andere 5 µg der Kontroll-Immunglobuline aus Normalserum, die dem Isotyp und der Spezies des spezifischen Antikörpers entsprachen, gegeben. Beide Ansätze wurden mindestens eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit je 1 ml Waschpuffer wurden die beiden Ansätze mit je einer Hälfte des Gewebelysats über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert, so dass der an die Beads gebundene Antikörper das im Lysat befindliche Antigen und seine Interaktionspartner binden konnte.

Zur Isolierung gebundener Proteine wurde die Säulenmatrix im Magneten separiert und ein Aliquot der Durchflüsse zur späteren Analyse aufbewahrt. Die Beads wurden anschließend fünf Mal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, bevor sie in 35 µl Probenelutionspuffer für die MS (2x) (s. 4.2) aufgenommen und für 20 Minuten auf 61 °C erhitzt wurden. Im Anschluss wurden die Beads im Magneten separiert, das Eluat abgenommen und die gebundenen Proteine ein zweites Mal mit 15 µl Probenelutionspuffer bei RT eluiert und die Eluate vereinigt. Die Lysat-Kontrolle und die Durchflüsse wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer gemischt, ebenfalls für 20 Minuten auf 61 °C erhitzt und mit den Eluaten auf ein SDS-PAGE-Gel (s. Abschnitt 5.2.3) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Präzipitierte Proteine wurden anschließend im Immunoblot (s. Abschnitt 5.2.4) detektiert.

5.2.5.4 Massenspektrometrischer Nachweis der Immunpräzipitate

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wurden die erhaltenen Immunpräzipitate (s. Abschnitt 5.2.5.3) nach der Überprüfung im Immunoblot in der Massenspektrometrie (MS) analysiert (Fujiwara, Uemura et al. 2014). Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Fecher-Trost (Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die zu analysierenden Proteine werden dafür zunächst einer enzymatischen Spaltung mit der Protease Trypsin unterzogen, wobei Peptidstücke einer bestimmten molekularen Masse entstehen, die in ihrer Gesamtheit den sogenannten Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF) eines Proteins ergeben (James, Quadroni et al. 1993). Unter Laserbeschuss werden die Peptide ionisiert, sodass sie in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und mit Hilfe eines Ionendetektors detektiert werden können (Cottrell 1994; Calvano, De Ceglie et al. 2014).

Zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie wurden die Proteine der Immunpräzipitate (s. Abschnitt 5.2.5.3) zunächst kurz mittels SDS-PAGE auf einem

Novex NuPage 4-12 % Bis-Tris Gradientengel separiert, das Gel in 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure fixiert und die Proteine mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung (s. 4.2) visualisiert. Die gefärbten Bereiche des Gels wurden in drei Teile geschnitten und zwei Mal alternierend mit Gel-Waschlösungen A und B (s. 4.2) gewaschen. Die Disulfidbrücken der Proteine wurden durch 30-minütige Inkubation der Gelstücke bei 56 °C in mit 10 mM DTT versetzter Gel-Waschlösung A reduziert. Anschließend wurden die Thiolgruppen für 30 Minuten bei 21 °C in mit 5 mM Iodacetamid versetzter Gel-Waschlösung A im Dunkeln methyliert. Nachdem die Gelstücke erneut zwei Mal alternierend mit Gel-Waschlösungen A und B gewaschen worden sind, wurden sie in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für die enzymatische Spaltung der Proteine im Gel wurden diese dann in 5 bis 15 µl Trypsin-Lösung (10 ng/µl) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die resultierenden Peptide wurden anschließend zwei Mal mit Gel-Extraktionspuffer (s. 4.2) aus dem Gel extrahiert, in der Vakuumzentrifuge konzentriert und in 0,1 % Ameisensäure (v/v) resuspendiert. Ein Aliquot der tryptisch gespaltenen Peptide wurde jeweils mit Hilfe der *online nanoflow liquid chromatography-high resolution* MS/MS (LC-HR-MS/MS) analysiert. Die Peptide wurden dabei in einer C18 *trap* Säule gefangen und in der Umkehrphasen-Chromatographie (*nano viper*) mit einer Flussrate von 300 nl/Minute mit Puffer A (0,1 % Ameisensäure (v/v)) und Puffer B (90 % Acetonitril (v/v) und 0,1 % Ameisensäure (v/v)) unter Verwendung entweder des Gradienten 1 (4 bis 55 % Puffer B in 60 Minuten, 55 bis 90 % in 7 Minuten) oder des Gradienten 2 (4 bis 55 % Puffer B in 120 Minuten, 55 bis 90 % in 7 Minuten) separiert. Der Durchfluss der Chromatographie wurde mit Hilfe der Elektrospray-Methode direkt in das Massenspektrometer injiziert und bei 2,2 kV ionisiert. Die MS-Spektren wurden in einem Daten-abhängigen Modus aufgenommen (automatischer Wechsel zwischen *full scan* MS und MS/MS). Die *full scan* MS-Spektren (m/z 300-1700) wurden im Orbitrap-Analyzer mit einem Zielwert von 10^6 aufgenommen und die 10 intensivsten Peptid-Ionen mit einer Ladung $> +2$ in der *high-pressure linear ion trap* mit Hilfe der *low-energy collision induced dissociation* mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35 % fragmentiert.

Die fragmentierten Peptide wurden mit Hilfe des MASCOT Algorithmus und der TF Proteome Discoverer 1.4 Software identifiziert; die Zuordnung der Peptide erfolgte mit Hilfe der Mascot Software Version 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) und der SwissProt Datenbank (Version 2013_04). Als feststehende Modifikation wurde dabei die Cystein-Methylierung, als variable Modifikationen die Desaminierung von Asparagin und Glutamin, die Acetylierung von Lysin und die Oxidation von Methionin zugelassen. Die MASCOT Output Dateien wurden zum besseren Vergleich in die Scaffold Software 4.0 (Proteome Software, Proteome Software Inc., Portland, USA) geladen. Um eine signifikante Proteinidentifikation zu gewährleisten, wurden der Proteinwahrscheinlichkeitsfilter auf 95 % und der Peptidwahrscheinlichkeitsfilter auf 90 % gesetzt. Die Identifikation von zwei einzigartigen Peptiden pro Protein wurde als

minimale Anzahl für eine verlässliche Identifikation betrachtet (Baker, Reeves et al. 2007). Ein mindestens fünffacher Überschuss von verlässlich identifizierten Peptiden eines Proteins in der RIM2-Immunpräzipitation gegenüber der Präzipitation mit normalen Antikörpern (Fujiwara, Uemura et al. 2014), oder ein Minimum von zwei verlässlich identifizierten Peptiden im RIM2-Präzipitat, wenn die Kontrolle keine Peptide des Proteins enthielt, wurde als Bindungspartner von RIM2 betrachtet (persönliche Mitteilung Dr. Claudia Fecher-Trost).

5.2.6 Immunzytochemische Untersuchungen

Zum Expressionsnachweis eines Proteins und zur Bestimmung seiner subzellulären Lokalisation wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei wurde ein Zwei-Antikörper-Detektionssystem verwendet, bei dem ein Primärantikörper das gesuchte Protein spezifisch erkennt und ein Sekundärantikörper den konstanten F_c-Teil des Primärantikörpers bindet. Die Bindung des Sekundärantikörpers wurde dann mit Hilfe einer Peroxidase-katalysierten Farbreaktion visualisiert und im Lichtmikroskop ausgewertet.

5.2.6.1 Herstellung von Spermienpräparaten für die Mikroskopie

Epididymale Spermien für die Herstellung mikroskopischer Präparate wurden zunächst wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben, isoliert und in PBS (s. 4.2) vorsichtig resuspendiert. Um die Zelldichte zu kontrollieren, wurden 10 µl der Suspension als Testtropfen auf einen Objektträger gegeben und im Mikroskop beurteilt. Anschließend wurde die Spermien suspension verdünnt, bis die Zellen in den wiederholt ausgestrichenen Testtropfen vereinzelt waren. Je zwei bis drei Tropfen mit 10 µl der verdünnten Spermien suspension wurden auf einen Objektträger gegeben und bei RT an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Präparate für fünf Minuten in PBS äquilibriert und für 15 Minuten bei RT in purem Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate für 15 Minuten unter dem Abzug belassen, bis sich das Methanol verflüchtigt hatte. Die Bereiche des Objektträgers, in denen sich die Spermien befanden, wurden mit einem Fettstift umrandet, damit bei der Färbung aufgetropfte Flüssigkeit in diesen Bereichen verbleibt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

5.2.6.2 Chromogene immunzytochemische Färbungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete chromogene Detektionsmethode zur Darstellung von Antikörperbindungen beruht auf der ABC-Methode (Hsu, Raine et al. 1981). Diese beinhaltet zum einen eine Farbreaktion, bei der ein chromogenes Substrat (3,3'- Diaminobenzidin, DAB) zu einem Farbstoff (braun) umgesetzt wird - katalysiert durch eine Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Zum anderen

wird das Ergebnis der Farbreaktion dadurch verstärkt, dass der Primärantikörper von einem biotinylierten Sekundärantikörper gebunden wird, der wiederum von einem Peroxidase-gekoppelten Avidin/Biotin-Komplex (AB) erkannt wird. Da ein Avidin-Molekül vier Biotin-Bindestellen besitzt und die Affinität zwischen Biotin und Avidin sehr hoch ist (Hsu, Raine et al. 1981), können so mehrere Enzyme pro gebundenem Primärantikörper das Substrat umsetzen.

Für die Färbungen wurden die Spermienpräparate (s. 5.2.6.1) zunächst für fünf Minuten in PBS (s. 4.2) rehydriert und endogene Peroxidasen anschließend durch eine 30-minütige Inkubation bei RT in einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung in 10 %igem Methanol in PBS blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Präparate für fünf Minuten in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Dafür wurden die Präparate für 30 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer in PBS inkubiert, das zuvor mit 0,3 % Triton X-100 und 10 % Normalserum, das aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper stammte, versetzt wurde. Die Primärantikörper wurden in 5 % Normalserum in 0,3 % Triton-PBS entsprechend der unter Abschnitt 4.4.1 aufgeführten Verdünnungen angesetzt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit den Präparaten inkubiert. Für die Peptidblockierung eines Antikörpers zur Überprüfung der Epitopspezifität wurde dieser vor der Verdünnung mit einem fünffachen Überschuss des immunogenen Peptids bei 4 °C rotierend vorinkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger drei Mal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und der in 5 % Normalserum in 0,3 % Triton-PBS verdünnte biotinylierte Sekundärantikörper (s. 4.4.2) aufgetropft. Nach zweistündiger Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in PBS entfernt. Anschließend wurden die Präparate für zwei Stunden mit dem ABC-Komplex, der nach Herstellerangaben (*Vectastain Elite ABC Kit*, Vector Labs) angesetzt wurde, bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für fünf Minuten in PBS wurden die Objektträger für 10 Minuten in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) inkubiert. Für die Farbreaktion wurde die DAB-Lösung nach Herstellerangaben (*SigmaFast* Tabletten, Sigma-Aldrich) angesetzt und für 10 Minuten auf die Präparate gegeben, bevor der Färbeprogang für fünf Minuten in bidestilliertem H_2O gestoppt und die Zellkerne zur besseren Orientierung mit Hämalaun-Lösung gegengefärbt wurden (Wu 1940). Dafür wurden die Objektträger für eine Minute in Hämalaun-Lösung getaucht und dann für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Präparate wurden anschließend mit vorgewärmter Glyceringelatine unter Deckgläschen konserviert und unter einem Lichtmikroskop (Olympus) analysiert.

5.2.7 Immunhistochemische Untersuchungen

In immunhistochemischen Untersuchungen wird sowohl die Expression eines Proteins nachgewiesen, als auch seine Lokalisation innerhalb eines Gewebeschnittes analysiert. Zur Detektion wurde, wie bei den immunzytochemischen Färbungen (s. 5.2.6), ein Zwei-Antikörper-System verwendet, das mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert wurde.

5.2.7.1 Fixieren und Einbetten der Gewebe

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden Mäusen und Ratten nach zervikaler Dislokation bzw. Begasung mit CO₂ vorsichtig entnommen, um eine Beschädigung der Gewebsstruktur zu vermeiden. Ohne Zeitverzug wurden diese dann in 3,7%ige Formaldehyd-Lösung in PBS (s. 4.2) überführt und für 24 – 48 Stunden bei RT fixiert. Anschließend wurden die Organe im Rechtsmedizinischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität mit Hilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol, Xylol) entwässert, in einer Gewebeeinbettapparatur paraffiniert und eingebettet. Die Paraffinpräparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.2.7.2 Anfertigen von Gewebeschnitten

Die gekühlten Paraffinpräparate (s. 5.2.7.1) wurden in ein Rotationsmikrotom eingespannt und in 3 – 6 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten, die mit Hilfe eines Objektträgers in ein 45 °C warmes Wasserbad überführt wurden. Durch die Wärme dehnte sich das Paraffin aus, wodurch die Gewebeschnitte geglättet wurden und so auf beschichtete Objektträger (Menzel) aufgezogen werden konnten. Zum Anheften der Schnitte an den Objektträger und zum Entfernen des Paraffins wurden die Objektträger für zwei Stunden bei 60 °C in einem Wärmeschrank senkrecht stehend inkubiert. Nachdem das Paraffin abgetropft war, wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.2.7.3 Chromogene immunhistochemische Färbungen

Da der Antikörperrnachweis bei immunhistochemischen Färbungen in wässriger Lösung erfolgt, mussten die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte (s. 5.2.7.2) rehydriert werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst zwei Mal für je 10 Minuten in Xylol-Ersatz und dann zwei Mal für je fünf Minuten in 100 %igem Ethanol inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für je fünf Minuten in 80 %igem Ethanol, in 70 %igem Ethanol und zuletzt in H₂O.

Bei der Fixierung in Formaldehyd-Lösung werden Proteine kovalent miteinander vernetzt, so dass viele Epitope für Antikörper nicht mehr erkennbar sind (Werner, Von Wasielewski et al. 1996). Zur Demaskierung der Antigene wurden die Gewebeschnitte daher für 10 Minuten in der Mikrowelle in Zitratpuffer (s. 4.2) gekocht und

anschließend für 30 Minuten in der Pufferlösung belassen und so auf RT abgekühlt. Dann wurden sie drei Mal für je fünf Minuten in PBS (s. 4.2) gewaschen und die Bereiche des Objektträgers, in denen sich die Schnitte befanden, mit einem Fettstift umrandet.

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte in Analogie zur immunzytochemischen Färbung der Spermienpräparate (s. 5.2.6.2), wobei zunächst endogene Peroxidasen blockiert, unspezifische Bindungsstellen abgesättigt und die Präparate über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden. Danach erfolgten die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, die ABC-Farbreaktion und eine Zellkernfärbung mit Hämalaun. Im Unterschied zu den Spermienpräparaten wurden die Gewebeschnitte jedoch nicht in Glyceringelatine konserviert, sondern in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dafür wurden die Objektträger für je fünf Minuten in 70 %igem und 80 %igem Ethanol, und zwei Mal für je fünf Minuten in 100 %igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für mindestens 10 Minuten in Xylol-Ersatz belassen und unter Deckgläschen luftblasenfrei mit *Eukitt* Eindeckmedium (Sigma-Aldrich) konserviert, bevor sie unter einem Lichtmikroskop ausgewertet wurden.

5.2.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Beate Wilhelm (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg) an Ultradünnschnitten von Mausspermien wie zuvor beschrieben durchgeführt (Ackermann, Zitranski et al. 2008). Das Prinzip der Immunogoldfärbungen entspricht dabei dem des indirekten Zwei-Antikörper-Detektionssystems der immunzytochemischen Färbungen (s. 5.2.6). Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurde jedoch ein an kolloidale Goldpartikel gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, der aufgrund der hohen Elektronendichte der Partikel in der Elektronenmikroskopie detektiert wird.

5.3 Reproduktionsbiologische Methoden

5.3.1 Isolierung von motilen epididymalen Nagerspermien und *in vitro* Kapazitation

Zur Gewinnung von epididymalen Spermien wurden den Tieren die Nebenhoden nach zervikaler Dislokation bzw. Begasung mit CO₂ entnommen und in eine Petrischale mit 2 ml (Maus) bzw. 6 ml (Ratte) auf 37 °C vorgewärmtem HS-Puffer (s. 4.2) gegeben. Nachdem die Nebenhoden vom umgebenden Fettgewebe befreit wurden, wurde der caudale Teil der Organe in eine frische, mit 2 ml bzw. 6 ml vorgewärmtem HS-Puffer gefüllte Petrischale überführt. Zur Gewinnung kapazitierter Spermien wurde der HS-Puffer durch eine entsprechende Menge Kapazitationspuffer (s. 4.2) ersetzt, der Calcium, Bicarbonat und BSA enthält und durch die Imitierung des Oviduct-Milieus die Kapazitation auch *in vitro* induzieren kann (de Lamirande, Leclerc et al. 1997). In beiden Puffern wurden die Nebenhoden eingeschnitten, so dass motile Spermien aus den Kanälchen in das umgebende Medium schwimmen konnten. Dafür wurden die nicht kapazitierten Spermien für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert; für die *in vitro* Kapazitation wurde diese Inkubationszeit um eine Stunde auf insgesamt 1,5 Stunden verlängert. Im Anschluss wurden die Spermien durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 500 x g und RT sedimentiert und der überstehende Puffer verworfen.

5.3.2 Bestimmung des Hodengewichts, der Anzahl motiler Spermien und Beurteilung der Spermienmorphologie

Um Auffälligkeiten der Reproduktionsorgane von Gen-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurde nach zervikaler Dislokation zunächst das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Anschließend wurden die Hoden entnommen und ebenfalls gewogen. Die Hoden wurden mindestens zwei Tage bei 37 °C getrocknet und dann das testikuläre Trockengewicht ermittelt. Um das relative Hodengewicht zu berechnen, wurden das Hodengewicht bzw. das Trockengewicht der Hoden zum Körpergewicht des jeweiligen Tieres in Relation gesetzt.

Zur Bestimmung der Anzahl motiler Spermien eines Tieres wurden der Spermien suspension kurz vor Beenden der *in vitro* Kapazitation (s. 5.3.1) 20 µl entnommen und 1:40 mit H₂O verdünnt. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellkonzentration bestimmt und bezogen auf das Gesamtvolumen berechnet.

Außerdem wurde ein Teil der Spermien auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und wie unter Abschnitt 5.3.3.2 beschrieben, mit Coomassiefärbelösung für Spermien

(s. 4.2) gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden Wildtyp- und Gen-defiziente Spermien auf auffällige morphologische Unterschiede hin überprüft.

5.3.3 Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion an Streptolysin-O permeabilisierten Spermien

Da in reifen Spermien keine Proteinbiosynthese stattfindet, sind sie molekularbiologischen Methoden wie Überexpressionsverfahren oder *small interfering* RNA (siRNA) Techniken nicht zugänglich (Carreau, Lambard et al. 2007). So wird die Funktion von Proteinen, für die es keine Membran-permeablen Inhibitoren oder Aktivatoren gibt, mit Hilfe von inhibitorisch wirkenden Antikörpern in Spermien untersucht, deren Plasmamembran zuvor mit dem bakteriellen Toxin Streptolysin-O (SLO) permeabilisiert wurde. SLO interagiert mit Cholesterinmolekülen in Membranen (Zitzer, Westover et al. 2003) und führt über eine Komplexbildung von Toxinmonomeren zur Ausbildung von Poren in der Membran (Bhakdi, Trantum-Jensen et al. 1985). Da die absolute Cholesterinmenge in der Spermienmembran während der Kapazitation zwar abnimmt, gleichzeitig aber eine Konzentrierung von Cholesterinhaltigen Lipid Rafts im Spermienkopf stattfindet (Zitanski, Borth et al. 2010), ist anzunehmen, dass die dem Akrosom aufliegende Plasmamembran ausreichend permeabilisiert wird. Die nur sehr wenig Cholesterin enthaltende akrosomale Membran (Hinkovska, Dimitrov et al. 1986; Parks, Arion et al. 1987) dagegen sollte weitgehend intakt bleiben.

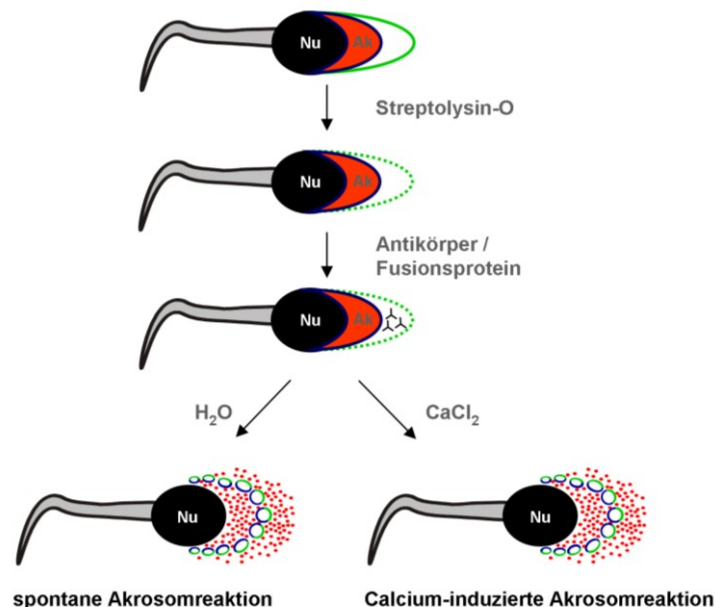


Abbildung 5.2: Schema der Versuchsdurchführung der funktionellen Untersuchungen der Akrosomreaktion an Streptolysin-O permeabilisierten Spermien.

Nu: Nukleus, Ak: Akrosom (modifiziert nach Nele Zitanski, Diplomarbeit 2008).

Nach der Inkubation der permeabilisierten Spermien mit den entsprechenden Antikörperverdünnungen wurde sowohl die spontane akrosomale Exocytoserate als auch die Exozytoserate nach Stimulation mit Calcium ermittelt (zur Übersicht s. Abbildung 5.2). Der Anteil Akrosom-reagierter Spermien wurde durch die Färbung der Spermien mit Coomassie Brilliant Blau bestimmt, bei der intakte akrosomale Vesikel aufgrund ihres hohen Proteingehalts tiefblau gefärbt werden (Lu, Lu et al. 2002).

5.3.3.1 Permeabilisierung mit SLO und Stimulation der Spermien

Für die Antikörper-Inhibition der Akrosomreaktion wurden kapazitierte Mausspermien (Balb/C) zunächst wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben, gewonnen. Das Spermienpräzipitat wurde dann in 2 ml auf 37 °C vorgewärmter modifizierter Krebs-Ringer-Lösung (KRB) (s. 4.2) aufgenommen. Die Spermien wurden erneut für fünf Minuten bei 500 x g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml warmem KRB, supplementiert mit 5 Enzymeinheiten (U)/ml SLO, aufgenommen. In je zwei Reaktionsgefäße wurde 1 µg des potentiell inhibitorisch wirkenden Antikörpers vorgelegt. Sofern das immunogene Peptid des Antikörpers erhältlich war, wurde in weitere zwei Reaktionsgefäße je 1 µg Antikörper vorgelegt und mit 5 µg des Blockierungspeptids zur Neutralisation des Antikörpers für mindestens 30 Minuten vorinkubiert. Zur Kontrolle wurden außerdem zwei Gefäße, die keinen Antikörper enthielten und zwei Ansätze mit 1 µg eines Kontroll-Immunglobulins aus Normalserum, das in Spezies und Isotyp dem Antikörper entsprach, vorbereitet. Anschließend wurden je 50 µl der Spermien suspension (resultierende Antikörperkonzentration 0,02 µg/µl) zu allen Ansätzen gegeben und die Spermien für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um einen Effekt der Antikörper auf die Calcium-induzierte Akrosomreaktion zu untersuchen, wurde je einem der doppelten Ansätze 5 µl einer 200 mM CaCl₂-Lösung (supramaximale Endkonzentration 10 mM (Hutt, Baltz et al. 2005)) zugegeben, während dem anderen Ansatz zur Bestimmung der spontanen Exozytoserate das gleiche Volumen H₂O zugesetzt wurde. So konnte gewährleistet werden, dass die Spermien der Doppelansätze identischen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt waren. Alle Ansätze wurden erneut für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und danach mit 600 µl (ca. das 10-fache des Volumens) Fixierungslösung für Spermien (s. 4.2) für 30 Minuten bei RT fixiert und anschließend der akrosomale Status bestimmt (s. 5.3.3.2). In die statistische Auswertung wurden lediglich die Versuchsreihen aufgenommen, bei denen die Calcium-Stimulation der Kontrollproben ohne Antikörperinkubation eine Erhöhung der Akrosomreaktionsrate um mindestens 10 Prozentpunkte zur Folge hatte. Da die Vorinkubation permeabilisierter Spermien mit Antikörpern *per se* zu einer leicht, aber nicht signifikant erhöhten akrosomalen Exozytose führte (Abbildung 6.2B), wurden die Daten zur Untersuchung der Calcium-induzierten Akrosomreaktion als Akrosomreaktionsindex dargestellt. Dafür wurde die Differenz der Calcium-

induzierten und der spontanen Akrosomreaktionsraten eines Antikörpers eines Versuchstages auf die Differenz von Positiv- und Negativkontrolle ohne Antikörpervorinkubation desselben Versuchstages normiert (Formel 6.1, S. 88).

Auch für die Untersuchung der Akrosomreaktion permeabilisierter Spermien nach Inkubation mit den MUPP1-GST-Fusionsproteinen wurden kapazitierte Mausspermien (Balb/C) zunächst wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben, gewonnen. Die Permeabilisierungsbedingungen wichen jedoch von denen der Antikörper-Inhibitionsversuche ab. Und zwar wurde das Spermienpräzipitat in 2 ml PBS aufgenommen und die Konzentration der Zellen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (s. 5.3.2). Anschließend wurden die Spermien erneut für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert und das Präzipitat in eiskaltem, mit 0,5 U/ml SLO versetztem PBS aufgenommen, sodass eine Konzentration von 5 - 10 x 10⁶ Spermien/ml resultierte. Die Suspension wurde dann für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Anlagerung des SLO an die Plasmamembran wurde überschüssige SLO-PBS-Lösung durch Zentrifugation vom Spermienpräzipitat getrennt und der Überstand verworfen. Die Spermien wurden dann in einem äquivalenten Volumen DTT-Puffer (s. 4.2) aufgenommen und für 20 Minuten bei 37 °C permeabilisiert. Die MUPP1-GST-Fusionsproteine wurden in Doppelansätzen in einer Konzentration von 0,5 µM zu den permeabilisierten Spermien gegeben und die Ansätze für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Vorinkubation der Spermien bei 37 °C wurde in je einem der doppelten Ansätze die CaCl₂-Konzentration auf 5 mM erhöht (Hutt, Baltz et al. 2005), während dem anderen Ansatz zur Bestimmung der spontanen Exozytoserate das gleiche Volumen H₂O zugesetzt wurde. Alle Ansätze wurden erneut für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach in einem 10-fachen Volumen Fixierungslösung für Spermien (s. 4.2) für 30 Minuten bei RT fixiert. Die Bestimmung des akrosomalen Status erfolgte wie unter Abschnitt 5.3.3.2 beschrieben. In die statistische Auswertung wurden lediglich die Versuchsreihen aufgenommen, bei denen die Calcium-Stimulation der Kontrollproben ohne GST-Fusionsproteine eine Erhöhung der Exozytoserate um mindestens 5 Prozentpunkte zur Folge hatte. Für die Zusammenfassung der Daten zur spontanen akrosomalen Exozytose, die in verschiedenen Versuchsreihen gewonnen wurden, wurden die Ergebnisse auf die basale Akrosomreaktionsrate der jeweiligen der Negativkontrollprobe normiert und als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

5.3.3.2 Coomassie-Färbung und Bestimmung des akrosomalen Status

Die fixierten Spermien wurden für eine Minute bei 13.000 x g sedimentiert, in 200 µl Postfixierungswaschpuffer (s. 4.2) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 30 µl abgenommen, die Spermien in dem Restüberstand resuspendiert und auf Objektträger, die zuvor mit einem Fettstift umrandet worden waren, ausgestrichen. Nach dem Trocknen bei RT wurden 200 - 300 µl der Coomassiefärbelösung für Spermien (s. 4.2) aufgetropft und für fünf Minuten mit den

Spermien inkubiert. Danach wurden diese gewaschen und mit vorgewärmter Glyceringelatine unter einem Deckglas konserviert.

Zur Quantifizierung der Akrosomreaktionsrate wurde der akrosomale Status von mindestens 200 Spermien pro Objektträger unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Ein stark blau gefärbter akrosomaler Bereich signalisiert die Anwesenheit des Akrosoms, wie in Abbildung 5.3 (Pfeile) beispielhaft gezeigt. Zur Wahrung der Objektivität wurde die Beschriftung der Objektträger vor dem Zählen durch Abkleben verdeckt und kodierte.

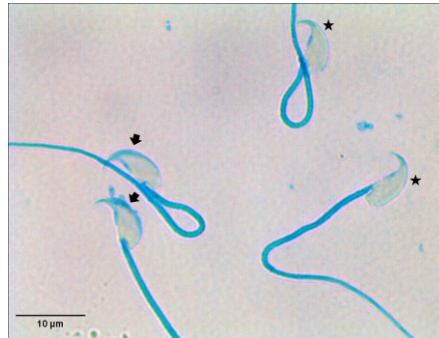


Abbildung 5.3: Coomassie-Färbung von Mausspermien.

Nach der Coomassie-Färbung ist das Akrosom als dunkelblaue Sichel am Mausspermienkopf erkennbar (Pfeile), während bei Akrosom-reagierten Spermien diese Markierung fehlt (Sterne).

5.3.4 Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion mit Hilfe des Calcium-Ionophors A23187

Um Unterschiede von Spermien in der Fähigkeit zur Akrosomreaktion im Allgemeinen zu festzustellen, wurden Spermien dem Calcium-Ionophor A23187 ausgesetzt, das für Calcium-Ionen permeable Poren in Membranen ausbildet und so den freien Fluss von Calcium-Ionen entlang eines Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran in das Zytoplasma der Spermien erlaubt (Brucker und Lipford 1995; Liu und Baker 1996; Kirkman-Brown, Punt et al. 2002). Dafür wurden die Spermien wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben isoliert und *in vitro* kapazitiert. Anschließend wurde die Konzentration der Zellen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (s. 5.3.2) und mit Kapazitationspuffer (s. 4.2) auf 3×10^6 Spermien/ml eingestellt. 50 µl der Spermiesuspension wurden dann einer Endkonzentration von 10 µM A23187 für 30 Minuten bei 37 °C ausgesetzt. Potentielle Effekte des Lösungsmittels des Ionophors wurden in einem Kontrollansatz überprüft, dem 0,1 % DMSO zugesetzt wurden. Durch Zugabe von 600 µl Fixierungslösung für Spermien (s. 4.2) wurden die Zellen für 30 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Spermien mit Coomassie gefärbt und die Akrosomreaktionsrate ermittelt (s. 5.3.3.2).

Die Effekte des Membran-permeablen CaMKII-Inhibitors Autocamtide-2 inhibitory peptide II (AIP2) auf die spontane und Calcium-induzierte Akrosomreaktion wurden nach Vorinkubation der Spermien mit dem Inhibitor ohne und mit anschließender

Calcium-Ionophor Behandlung untersucht. Dafür wurden isolierte, *in vitro* kapazitierte Balb/C Spermien (s. 5.3.1) in Doppelansätzen verschiedenen Verdünnungen des Inhibitors in Kapazitationspuffer für 20 Minuten bei 37 °C ausgesetzt. Anschließend wurde je einem der doppelten Ansätze 10 µM A23187, dem Anderen zur Kontrolle unspezifischer Effekte des Lösungsmittels 0,1 % DMSO zugesetzt und alle Ansätze für weitere 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe eines 10-fachen Volumens Fixierungslösung für Spermien (s. 4.2) wurden die Zellen für 30 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Spermien mit Coomassie gefärbt und die Akrosomreaktionsrate ermittelt (s. 5.3.3.2).

5.3.5 Funktionelle Untersuchung der Akrosomreaktion durch Stimulation mit solubilisierter *Zona pellucida*

Aus Mausovarien präparierte extrazelluläre Matrix von Oocyten, die *Zona pellucida*, kann durch Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten aufgrund ihrer spezifischen Dichte angereichert werden. Durch eine pH-Verschiebung und gleichzeitige Erwärmung kann die glykoproteinreiche Matrix in Lösung gebracht und für die Stimulation von Spermien eingesetzt werden (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009). Da *Zonae pellucidae* aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Glykoproteinen die Tendenz haben an negativ geladenen Glas- und Plastikoberflächen zu haften, wurden alle verwendeten Gebrauchswaren zuvor mit *Sigmacote* (Sigma-Aldrich) beschichtet.

5.3.5.1 Präparation und Solubilisierung von *Zona pellucida*

Insgesamt 20 mindestens drei Wochen alten weiblichen Mäusen (Balb/C oder C57BL/6) wurden nach zervikaler Dislokation die Ovarien ohne Fett und ohne Eileiter entnommen und in 2 ml eisgekühlten HB-Puffer (s. 4.2), versetzt mit Proteaseinhibitor, 0,2 mg/ml Aprotinin und 0,2 mg/ml DNase, überführt. Das Gewebe wurde zunächst in einem Dounce-Homogenisator (Kontes) zerkleinert und nach Zugabe von je 200 µl Igepal (10 % in HB-Puffer) und Natriumdesoxycholat (10 % in HB-Puffer) homogenisiert, bis keine sichtbaren Gewebestückchen mehr vorhanden waren. Dann wurde das Homogenisat auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten geschichtet, der sich aus 3 ml einer 22 %-igen, 2 ml einer 10 %-igen und 2 ml einer 2 %-igen Percollschicht in mit Proteaseinhibitor, Aprotinin und DNase versetztem HB-Puffer zusammensetzte. Die Auftrennung des Homogenisats im Dichtegradienten erfolgte für zwei Stunden bei 200 x g und 4 °C in dem Eppendorf Ausschwingrotor A-4-44. Die so mit intakten *Zonae* angereicherte 10 %-ige Percollschicht wurde vorsichtig entnommen, mit HB-Puffer, versetzt mit Proteaseinhibitor, auf ein Volumen von 45 ml aufgefüllt und auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurden die *Zonae* sedimentiert, der Überstand bis auf 500 µl abgenommen und verworfen. Die Präzipitate wurden im Restüberstand resuspendiert, vereinigt und

erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die *Zonae* in einem einzigen Reaktionsgefäß konzentriert waren. Dieses wurde noch einmal für 10 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde dann in 1,5 ml mit Proteaseinhibitor versetztem HS-Puffer (s. 4.2) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach wiederholter Resuspension und Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat in 100 µl mit Proteaseinhibitor versetztem HS-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der *Zona*-Konzentration wurden drei Tropfen von je 1 µl Volumen auf einen Objektträger getropft und die Zahl intakter *Zonae* gezählt, woraus die Konzentration und die Anzahl der *Zonae* im Gesamtvolumen berechnet wurden.

Die Solubilisierung der Glykoproteine erfolgte über eine Verschiebung des pH-Wertes mit gleichzeitiger Erwärmung. Bei diesem Vorgang wurde das gleiche Volumen mit Proteaseinhibitor versetztem HS-Puffer ohne *Zonae* mitgeführt und identisch behandelt, so dass es als Puffer-Kontrolle für die *Zona*-Stimulation dienen konnte. In Vorversuchen wurde ermittelt, welches Volumen einer konzentrierten HCl-Lösung zur Reduzierung des pH-Wertes auf 2,5 im HS-Puffer notwendig ist und ein entsprechendes Volumen der *Zona*-Suspension und der Puffer-Kontrolle zugesetzt. Zur Überprüfung des pH-Wertes wurde ein kleiner Tropfen beider Gemische auf ein Indikatorpapier gegeben. Beide Ansätze wurden dann für 15 Minuten auf 37 °C erwärmt und nicht-solubiliertes Material anschließend für zwei Minuten bei 16.000 x g und RT sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend mit einem in Vorversuchen ermittelten Volumen 5 M NaOH-Lösung auf pH 7,5 neutralisiert und ein kleiner Tropfen beider Gemische auf einem Indikatorpapier überprüft. Das Solubilisat wurde dann so portioniert, dass das Volumen 500 solubilierten *Zonae* entsprach und die Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.3.5.2 Stimulation der Spermien mit *Zona pellucida*

Kapazitierte Wildtyp- und Gen-defiziente Mausspermien wurden wie unter Abschnitt 5.3.1 beschrieben isoliert, wobei jeweils nach 0, 30, 60 und 90 Minuten 20 µl der Spermiesuspension entnommen und zur Bestimmung der spontanen Akrosomreaktionsrate fixiert wurden (s.u.). Die Konzentration der Zellen wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (s. 5.3.2) und mit Kapazitationspuffer (s. 4.2) auf 3×10^6 Spermien/ml eingestellt. 50 µl der Spermiesuspension wurden dann entweder zu den kurz zuvor bei 37 °C im Wasserbad aufgetauten solubilierten *Zonae*, einem identischen Kontroll-Puffer-Volumen (s. 5.3.5.1) oder in ein leeres Reaktionsgefäß zur Bestimmung der Spontanrate nach 120 Minuten gegeben. Alle Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 600 µl Fixierungslösung für Spermien (s. 4.2) für 30 Minuten bei RT fixiert wurden. Anschließend wurden die Spermien mit Coomassie gefärbt und die Akrosomreaktionsrate ermittelt (s. 5.3.3.2).

5.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen *Excel 2007* (Microsoft) und *Prism 5.0* (Graphpad). Die lineare Abhängigkeit zweier Merkmale wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) berechnet. Zur Überprüfung der Normalverteilung eines Datensatzes wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test herangezogen, signifikante Ausreißer mit Hilfe des Grubb's Outlier Test (www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm) ermittelt und ggf. von der Auswertung ausgeschlossen. Soweit nicht anders angegeben, sind die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt, sofern die Stichproben der einen Gruppe eindeutig denen der anderen Gruppe zugeordnet werden konnten. War dies nicht der Fall, wurde ein studentischer T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. In jedem Fall wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

5.5 Tierhaltung

Die für diese Arbeit verwendeten Inzuchtmausstämme C57Bl/6 und Balb/C wurden entweder im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg oder in der Tierzuchtanlage des Walther-Straub-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) gezüchtet. Die Tiere wurden in einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden in isolierten, individuell belüfteten Käfigen (IVC, Techniplast, Hohenpeißenberg) mit maximal sechs ausgewachsenen Tieren pro Käfig bei einer Raumtemperatur von 22 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nagerfutter (SNIFF Spezialdiät, Soest) und das Einstreumaterial (Lignocel Select, Rettermaier und Söhne, Rosenberg) wurde ein- bis zweimal pro Woche durch Frisches ersetzt. Ein kontinuierliches monogames Zuchtsystem wurde verwendet, das nur in Einzelfällen durch das Zusammensetzen von zwei Weibchen und einem Männchen substituiert wurde. Zuchtpaare erhielten spezielles Zuchtfutter (SNIFF Spezialdiät, Soest) und Nestbaumaterialien (Nestlets, Plexx, Elst, Niederlande) und die Jungtiere wurden im Alter von drei Wochen abgesetzt und im Folgenden nach Geschlecht getrennt gehalten.

Die RIM2 α -defizienten Mäuse wurden im Haus für experimentelle Therapie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gezüchtet. Adulte, männliche Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Susanne Schoch (Institut für Neuropathologie und Epileptologie des Universitätsklinikums der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-

Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und in der Tierzuchtanlage des Walther-Straub-Instituts der LMU bis zur weiteren Verwendung wie oben beschrieben gehalten. Der Inzuchtrattenstamm *Sprague Dawley* wurde in der Tierzuchtanlage des Adolf-Butenandt-Instituts für Physiologie der LMU gezüchtet und adulte, männliche Ratten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. *Wistar* Ratten wurden entweder im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg gezüchtet oder direkt von Charles River bezogen.

6 Ergebnisse

6.1 Expression und Funktion der Gerüstproteine Bassoon und Piccolo/Aczonin in Nagerspermien

6.1.1 Immunzytochemischer Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in Mausspermien

Die mit Abstand größten Multidomänen-Proteine der *cytomatrix of the active zone* (CAZ), mit den meisten Bindungsdomänen und somit besonders vielen potentiellen Interaktionsmöglichkeiten, sind Bassoon (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998) und Piccolo/Aczonin (Fenster, Chung et al. 2000; Abbildung 3.10). Um zu prüfen, ob ein CAZ-ähnliches Proteinnetzwerk als molekulare Basis für die Regulation der multiplen Fusionsporenbildung während der Akrosomreaktion in Frage kommt, wurde zunächst die Expression dieser beiden Gerüstproteine in Nagerspermien analysiert. Da die extrem hohe molekulare Masse von Bassoon (> 400 kDa) und Piccolo/Aczonin (> 500 kDa; Cases-Langhoff, Voss et al. 1996; tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998; Wang, Kibschull et al. 1999) ihren Nachweis im Immunoblot technisch sehr schwierig macht (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998; Wang, Kibschull et al. 1999; Fenster, Chung et al. 2000; Sudhof 2012; Abbildung 6.5), wurde zunächst mit Hilfe von indirekten immunzytochemischen Untersuchungen überprüft, ob die beiden riesigen Gerüstproteine in Spermien exprimiert werden und möglicherweise eine distinkte subzelluläre Lokalisation in den stark kompartimentierten Keimzellen aufweisen.

Bei den indirekten immunzytochemischen Färbungen von *in vitro* kapazitierten, epididymalen Mausspermien wurden spezifische, gegen C-terminale Epitope von Bassoon bzw. Piccolo/Aczonin generierte, polyklonale Antikörper eingesetzt (Abbildung 6.2A). Gebundener Primärantikörper wurde mit Hilfe der ABC-Methode visualisiert (s. Abschnitt 5.2.6.2), bei der das Immunsignal durch die Bildung von Avidin/Biotin-Komplexen zusätzlich verstärkt wird (Hsu, Raine et al. 1981). Als Farbreagenz für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase diente das chromogene Substrat DAB, das durch die Peroxidase in braune Farbpartikel umgesetzt wurde, die sich am Ort der Substratumsetzung niederschlugen. Zur besseren Darstellung der Morphologie des Spermienkopfes wurde der Zellkern mit Hilfe des

blauen Farbstoffs Hämalaun angefärbt (Wu 1940). In diesen Ansätzen wurde außerdem quantifiziert, wie hoch der prozentuale Anteil an Spermien war, der entweder Bassoon oder Piccolo/Aczonin exprimiert. Hierzu wurde bei der mikroskopischen Analyse für jede der insgesamt vier unabhängigen Färbungen von unterschiedlichen Spermienpräparationen der Anteil gefärbter Keimzellen ausgezählt, wobei zwischen einer akrosomalen und einer Flagellummarkierung unterschieden wurde. Dies ist insbesondere wichtig, da ein akrosomales Immunsignal von an der Akrosomreaktion beteiligten Proteinen nach erfolgter Exozytose nicht mehr zu beobachten ist (Heydecke, Meyer et al. 2006). Für *in vitro* kapazitierte Mausspermien von Versuchstierstämmen ist bekannt, dass infolge der *in vitro* Kapazitation bei ca. 20 bis 40 % der Spermien einer Präparation die Akrosomreaktion auch ohne externen Stimulus spontan abläuft (Abbildung 6.24 und 6.27; Escoffier, Jemel et al. 2010; Sebkova, Ded et al. 2014). Eine näherungsweise Übereinstimmung des quantifizierten Anteils von Spermien ohne Bassoon- und/oder Piccolo/Aczonin-Immunmarkierung mit dem Anteil spontan Akrosom-reagierter Spermien (Escoffier, Jemel et al. 2010; Sebkova, Ded et al. 2014) kann einen Hinweis darauf geben, dass das akrosomale Immunsignal nach erfolgter Exozytose ausbleibt und die nachgewiesenen Proteine daher funktionell an der Akrosomreaktion beteiligt sein könnten (Young, Grasa et al. 2009).



Abbildung 6.1: Expression und Lokalisation von Bassoon und Piccolo/Aczonin in epididymalen Mausspermien.

Zur Analyse der Expression und der subzellulären Lokalisation von Bassoon und Piccolo/Aczonin wurden indirekte immunzytochemische Färbungen an kapazitierten, epididymalen C57BL/6 Mausspermien durchgeführt. Gebundener Primärantikörper ist durch die Präzipitation des braunen Chromogens DAB zu erkennen; die Komplementärfärbung der Zellkerne erfolgte durch den blauen Farbstoff Hämalaun. Die Inkubation mit dem anti-Bassoon Antikörper resultierte in einer sichelförmigen Markierung im akrosomalen Bereich des Spermienkopfes von im Mittel $63,0 \pm 4,0$ % der Spermien ([Bassoon], Pfeilspitze), wohingegen eine Färbung des Flagellums in keiner der analysierten Keimzellen erkennbar war. Der anti-Piccolo/Aczonin Antikörper zeigte zusätzlich zu der intensiven Färbung der akrosomalen Sichel ([Piccolo], Pfeilspitze) von im Mittel $67,5 \pm 3,8$ % der Spermien eine schwache Immunmarkierung des Spermienchwanzes ([Piccolo], Pfeil). Die Negativkontrolle ohne Primärantikörperinkubation [Kontrolle] zeigte keine Braunfärbung. Die Aufnahmen zeigen repräsentative Resultate aus vier Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen.

In den Mausspermien eines zugehörigen Kontrollpräparates, das in den immunzytochemischen Färbungen ohne Primärantikörper, aber mit Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mit DAB-Substrat behandelt wurde, war keine Immunmarkierung zu beobachten (Abbildung 6.1, [Kontrolle]). Die Spermien,

die mit dem anti-Bassoon Antikörper inkubiert wurden, wiesen hingegen eine braune Markierung des konvexen Randes des Spermienkopfes auf. Die Färbung war auf den anterioren akrosomalen Bereich beschränkt (Abbildung 6.1, [Bassoon], Pfeilspitze), während im Flagellum keine Markierung erkennbar war. Die Quantifizierung gefärbter Spermien in den vier Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen ergab, dass im Mittel $63,0 \pm 4,0$ % der Spermien ein solches akrosomales Bassoon-Immunsignal aufwiesen. Der immunzytochemische Nachweis mit dem anti-Piccolo/Aczonin Antikörper führte zwar zu einer schwachen Färbung des Flagellums (Abbildung 6.1, [Piccolo], Pfeil), jedoch war auch eine akrosomale Markierung auszumachen. Diese fiel deutlich intensiver aus als die Bassoon-Immunmarkierung (Abbildung 6.1, [Piccolo], Pfeilspitze) und war im Mittel bei $67,5 \pm 3,8$ % der analysierten kapazitierten Spermien zu erkennen.

Die spontane Akrosomreaktionsrate von *in vitro* kapazitierten, ansonsten aber unbehandelten Spermien verschiedener Präparationen, die in der vorliegenden Arbeit in funktionellen Studien analysiert wurden, betrug ca. 20 bis 30 % (Abbildung 6.24 und 6.27). Daraus ergibt sich, dass etwa 70 bis 80 % der kapazitierten Spermien über ein intaktes Akrosom verfügen. Ein vergleichbarer, wenn auch geringfügig niedrigerer Anteil der kapazitierten Spermien zeigte auch eine akrosomale Bassoon- bzw. Piccolo/Aczonin-Immunmarkierung (Abbildung 6.1). Diese quantitative Übereinstimmung lässt vermuten, dass das Immunsignal beider CAZ-Proteine hauptsächlich in der akrosomalen Region von Akrosom-intakten Spermien zu beobachten war.

6.1.2 Funktionelle Beteiligung von Bassoon und Piccolo/Aczonin an der Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion ist ein spezialisierter Sekretionsprozess, bei dem die Exozytose des riesigen akrosomalen Vesikels durch die Bildung hunderter einzelner Fusionsporen zwischen der äußeren akrosomalen Membran und der darüber liegenden Plasmamembran ermöglicht wird (Harper, Cummerson et al. 2008; Zanetti und Mayorga 2009; Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). Markante Merkmale dieser Reaktion sind, dass die Fusion von Akrosom und Plasmamembran insgesamt über einen großflächigen Bereich des anterioren Spermienkopfes stattfindet, wobei sich die Bildung der einzelnen Fusionsporen Reißverschluss-artig fortsetzt (Barros, Bedford et al. 1967; Abbildung 3.3). Die molekularen Regulationsmechanismen, die dieser räumlich gerichteten Ausbreitung der Fusionsporenbildung zu Grunde liegen, sind bislang jedoch weitgehend unverstanden (Michaut, Tomes et al. 2000; Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009). Aufgrund der beobachteten akrosomalen Lokalisation der Multidomänenproteine Bassoon und Piccolo/Aczonin stellte sich die Frage, ob die beiden Gerüstproteine durch eine Rekrutierung von Komponenten der akrosomalen

Fusionsmaschinerie die über eine enorme Fläche stattfindenden, einzelnen Exozytose-Ereignisse im Spermienkopf räumlich und/oder zeitlich koordinieren könnten. Im Folgenden wird daher beschrieben, welcher experimentelle Ansatz zur Überprüfung dieser These verfolgt wurde.

Erste Überlegungen, für die Analyse Membran-permeable Inhibitoren gegen die beiden Gerüstproteine einzusetzen, sind gegenwärtig experimentell nicht umsetzbar, da entsprechende pharmakologische Agentien nicht zur Verfügung stehen. Aufgrund fehlender Proteinbiosynthese sind reife Spermien darüber hinaus auch nicht für klassische Überexpressionsverfahren oder *small interfering* RNA (siRNA) Techniken zugänglich (Carreau, Lambard et al. 2007). Daher wurden die für die immunzytochemischen Färbungen verwendeten Primärantikörper (Abbildung 6.1) zur sterischen Inhibition der endogenen Zielproteine eingesetzt (Hutt, Baltz et al. 2005). Anschließend wurde die akrosomale Exozytoserate quantifiziert und der Effekt der Antikörper auf die Exozytoserate bestimmt. Diese Methode wurde u. a. bereits erfolgreich für die Analyse der funktionellen Beteiligung des Calcium-Sensorproteins Synaptotagmin an der akrosomalen Exozytose in Spermien eingesetzt (Michaut, De Blas et al. 2001; Hutt, Baltz et al. 2005). Außerdem wurde sie für die Bestimmung der Beteiligung einzelner Proteine an Sekretionsprozessen in anderen Zellsystemen, wie z. B. neurosekretorischen PC12-Zellen, angewandt (Ahnert-Hilger, Bader et al. 1989). Um die Antikörper ins Innere der Spermien zu transferieren, ist es zunächst erforderlich, die Plasmamembran der Keimzellen selektiv zu permeabilisieren, ohne dabei andere Membranen intrazellulärer Organellen zu beschädigen. Dazu wurde in den hier vorgestellten Studien das bakterielle Toxin Streptolysin-O (SLO) verwendet (Bhakdi, Weller et al. 1993), das bereits für vergleichbare Studien an Spermatozoa erfolgreich eingesetzt wurde (Michaut, De Blas et al. 2001; Hutt, Baltz et al. 2005). SLO bildet nach der Interaktion mit Cholesterin in der Plasmamembran Poren aus (Bhakdi, Trantum-Jensen et al. 1985; Zitser, Westover et al. 2003), die für eine Passage von Antikörpern ausreichend groß sind (Walev, Bhakdi et al. 2001). Aufgrund ihres geringen Cholesteringehalts bleiben dagegen intrazelluläre Membranen, wie die akrosomale Membran, weitgehend intakt (Parks, Arion et al. 1987; Hinkovska-Galcheva und Srivastava 1993).

Mit Hilfe der in Abbildung 6.2A spezifizierten anti-Bassoon und anti-Piccolo/Aczonin Antikörper wurde eine potentielle Beteiligung von Bassoon und Piccolo/Aczonin an der akrosomalen Exozytose untersucht. Dabei ist zu beachten, dass der Verlust des Akrosoms nicht nur durch die Calcium-vermittelte, direkte Aktivierung des SNARE-Fusionsapparates (Hutt, Baltz et al. 2005) hervorgerufen werden kann, sondern auch ohne die Applikation extrazellulärer Stimuli infolge der Kapazitation spontan auftreten kann (Klemm und Engel 1991). Daher wurde bestimmt, ob die anti-Bassoon und anti-Piccolo/Aczonin Antikörper diese spontane akrosomale Exozytose beeinflussen und zudem quantifiziert, welchen Effekt die Antikörper auf die Calcium-induzierte

Aktivierung des SNARE-Fusionsapparates haben. In den durchgeführten Analysen wurden *in vitro* kapazitierte und mit SLO permeabilisierte Spermien mit gleichen Konzentrationen der in Kaninchen generierten anti-Bassoon bzw. anti-Piccolo/Aczonin Antikörper inkubiert, bevor die Exozytoserate quantifiziert wurde. Tabelle 6.1 gibt eine kurze Übersicht über die experimentellen Ansätze der *in vitro* Exozytose-Studien. Zur Bestimmung der basalen, spontan stattfindenden Exozytoserate wurde in jeder der durchgeführten Versuchsreihen eine Spermienprobe mitgeführt, die nach der Permeabilisierung mit SLO nicht mit Antikörpern inkubiert und auch nicht mit Calcium stimuliert wurde (Tabelle 6.1, Negativkontrolle). Um darüber hinaus die Effizienz der Permeabilisierung jeder einzelnen Spermienpräparation zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Spermien jedes Ansatzes mit 10 mM CaCl₂ inkubiert (Tabelle 6.1, Positivkontrolle). Diese beiden Kontrollansätze erlaubten, in der anschließenden Auswertung nur Ansätze mit ausreichend permeabilisierten Spermien zu berücksichtigen. Als Ausschlusskriterium wurde festgelegt, dass lediglich diejenigen Versuchsreihen in die Gesamtauswertung eingehen, bei denen die Differenz der Akrosomreaktionsraten von Positiv- und Negativkontrolle mehr als 10 Prozentpunkte betrug (s. Abschnitt 5.3.3.1; Bustos, Lucchesi et al. 2012).

Tabelle 6.1: Analyse der funktionellen Rolle von Bassoon und Piccolo/Aczonin bei der Akrosomreaktion: Experimentelle Ansätze der *in vitro* Akrosomreaktionsstudien an SLO-permeabilisierten Spermien.

Spontane Akrosomreaktion	Zugabe von	
	Antikörper	Calcium
Negativkontrolle, [Kontrolle]	–	–
Antikörper <i>per se</i>	Kaninchen IgG	–
Epitop-spezifischer Antikörper	anti-Bassoon bzw. anti-Piccolo IgG	–
neutralisierter spezifischer Antikörper	IgG + immunogenes Protein (BP)	–
Calcium-induzierte Akrosomreaktion		
Positivkontrolle, [Calcium]	–	+
Antikörper <i>per se</i>	Kaninchen IgG	+
Epitop-spezifischer Antikörper	anti-Bassoon bzw. anti-Piccolo IgG	+
neutralisierter spezifischer Antikörper	IgG + immunogenes Protein (BP)	+

Für die Analyse wurde außerdem überprüft, ob potentielle Änderungen der akrosomalen Exozytose auf spezifische Bindungen der anti-Bassoon bzw. anti-Piccolo/Aczonin Antikörper zurückzuführen sind. Um den Einfluss durch die Inkubation der Spermien mit Antikörpern *per se* auszuschließen, wurde in jeder Versuchsreihe eine weitere Negativkontrolle mitgeführt. In dieser wurde die Spermienprobe mit der gleichen Menge an Affinitäts-gereinigten Antikörpern aus Normalserum nicht immunisierter Kaninchen vorinkubiert, die nachfolgend als Kaninchen IgGs bezeichnet werden. Mit Hilfe der Kaninchen IgG-Negativkontrolle konnte die akrosomale Exozytoserate bestimmt werden, die durch die Zugabe von Antikörpern der gleichen Donorspezies (Kaninchen) und des gleichen Isotyps

(Immunglobulin G, IgG) wie die anti-Bassoon und anti-Piccolo/Aczonin Antikörper induziert wird (Tabelle 6.1, Antikörper *per se*). Als weitere Spezifitätskontrolle der Antikörperbindung wurden darüber hinaus die immunogenen Proteine, gegen die die Antikörper generiert wurden, zur Neutralisation der jeweiligen IgGs eingesetzt (Ackermann, Zitanski et al. 2008; Tabelle 6.1, neutralisierter spezifischer Antikörper). Um die entsprechende Epitop-Binderegion der F_{ab}-Fragmente der Antikörper zu neutralisieren, wurden die Antikörper vor der Zugabe zu den Spermien jeweils mit der fünffachen Menge des immunogenen Proteins vorinkubiert (s. Abschnitt 5.3.3.1).

Abbildung 6.2 fasst die quantifizierten Effekte der Antikörper auf den prozentualen Anteil der spontan stattfindenden Akrosomreaktion [B] und die durch Calcium ausgelöste Exozytose [C] zusammen. Die in der schwarzen Säule in Abbildung 6.2B dargestellte Positivkontrolle [Calcium] zeigt, dass die Calcium-stimulierte Akrosomreaktionsrate der permeabilisierten Spermien bei den sieben hier gemittelten Versuchsreihen im Durchschnitt ca. 14 Prozentpunkte höher war als die spontane Exozytoserate der Negativkontrolle [Kontrolle]. Für die spontan stattfindende Akrosomreaktion ergab sich eine mittlere Exozytoserate von $24,98 \pm 1,92$ % (Abbildung 6.2B, [Kontrolle]; Bustos, Lucchesi et al. 2012). Eine ähnliche Rate Akrosom-reagierter Spermien nach SLO-Permeabilisierung wurde auch in vergleichbaren Studien mit murinen (Kitamura, Tanaka et al. 2003) und humanen (Michaut, De Blas et al. 2001) Spermien bestimmt. Vergleicht man nun die nach Zugabe von Kaninchen IgG quantifizierte spontane Akrosomreaktionsrate mit der Spontanrate der Negativkontrolle ohne Antikörper, zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Akrosomreaktionsrate (Abbildung 6.2B, [Kaninchen IgG]: $28,87 \pm 3,03$ %), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Kaninchen IgGs die Exozytose *per se* kaum beeinflussen.

Das Ergebnis der Inhibition von Bassoon und Piccolo/Aczonin bei der spontanen Akrosomreaktion wird bei einem direkten Vergleich der Effekte der anti-Bassoon bzw. anti-Piccolo/Aczonin Antikörper und der Kaninchen IgGs deutlich. Die beiden Epitop-spezifischen Antikörper bewirkten eine vergleichbar geringe (3 bis 4 Prozentpunkte), nicht signifikante Steigerung der spontanen Exozytoserate (Abbildung 6.2B, [anti-Bassoon]: $28,07 \pm 2,34$ %, bzw. [anti-Piccolo]: $28,68 \pm 2,41$ %), wie sie auch in der Kontrolle mit Kaninchen IgGs auszumachen war. Folglich konnte weder für Bassoon noch für Piccolo/Aczonin eine funktionelle Rolle bei der spontan stattfindenden Exozytose in Spermien registriert werden. Dieser Befund wurde durch die Ansätze, in denen die jeweiligen Antikörper durch die vorherige Neutralisation mit ihrem immunogenen Protein abgesättigt wurden, nochmals bestätigt (anti-Bassoon + BP: $29,31 \pm 1,61$ %, nicht gezeigt; Abbildung 6.2B, [anti-Piccolo + BP]: $24,99 \pm 1,45$ %).



[B] Um zu überprüfen, ob Bassoon und Piccolo/Aczonin an der spontanen Akrosomreaktion beteiligt sind, wurden *in vitro* kapazitierte und mit SLO permeabilisierte Balb/C Mausspermien entweder mit anti-Bassoon oder anti-Piccolo/Aczonin Antikörpern inkubiert. Zur Quantifizierung der spontanen Akrosomreaktionsrate wurden Spermienproben in den Versuchsreihen mitgeführt, denen kein Antikörper zugegeben wurde [Kontrolle]. Zur Bestimmung von unspezifischen Effekten der Antikörperinkubation *per se* wurde außerdem ein Aliquot der Spermien mit der gleichen Menge an Affinitäts-gereinigten Antikörpern aus normalem Kaninchenserum vorinkubiert [Kaninchen IgG]. Durch die Zugabe von CaCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM wurde eine erfolgreiche Permeabilisierung der Spermien überprüft [Calcium]. Die Darstellung der quantifizierten spontanen Akrosomreaktionsraten zeigt, dass die basale Exozytose durch die Zugabe der Kaninchen-Antikörper leicht, aber nicht signifikant (n. s.) erhöht wurde. Das Gleiche gilt für die beiden Antikörper, die den C-Terminus von Bassoon [anti-Bassoon] bzw. Piccolo/Aczonin [anti-Piccolo] detektieren. Die vorherige Neutralisation des anti-Piccolo/Aczonin Antikörpers mit der fünffachen Menge des entsprechenden immunogenen Proteins [anti-Piccolo + BP] führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der spontanen Exozytose im Vergleich zur Negativkontrolle. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten \pm SEM von 7 unabhängigen Spermienpräparationen.

Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und ist mit *: $p < 0,05$ und **: $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Neben der funktionellen Rolle von Bassoon und Piccolo/Aczonin bei der spontanen akrosomalen Exozytose wurden die beschriebenen Antikörper eingesetzt, um die Bedeutung der beiden CAZ-Proteine für die durch Calcium ausgelöste Aktivierung der SNARE-vermittelten Akrosomreaktion zu analysieren. Parallel zu den in Abbildung 6.2B dargestellten Versuchsreihen wurden experimentelle Ansätze durchgeführt, in denen die akrosomale Exozytose nach Antikörperinkubation durch die Zugabe von 10 mM CaCl_2 ausgelöst wurde. Da eine Vorbehandlung der Spermien mit Kaninchen IgG *per se* zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Steigerung der basalen Exozytoserate führte (Abbildung 6.2B), wurde zur ausschließlichen Erfassung der Antikörperwirkung auf die durch Calcium induzierte Exozytose der Akrosomreaktionsindex berechnet (s. Abschnitt 5.3.3.1; Formel 6.1; Rodriguez, Zanetti et al. 2012). Dazu wurde von der durch Calcium induzierten Akrosomreaktionsrate nach einer Antikörperbehandlung die jeweilige zugehörige spontane Exozytoserate nach Applikation desselben Antikörpers (Tabelle 6.1) subtrahiert. Anschließend wurde die resultierende Differenz als Prozentsatz der Induktion, also der Differenz von Positiv- und basaler Negativkontrolle dargestellt (Formel 6.1). Aus dieser Formel resultiert außerdem, dass der durch Calcium induzierte Exozytoseindex der Positivkontrolle 100 % entspricht.

$$\text{Akrosomreaktionsindex} = \frac{(\text{Antikörper mit Calcium} - \text{Antikörper spontan})}{(\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle})} \times 100 \%$$

Formel 6.1: Formel zur Berechnung des Akrosomreaktionsindex.

Auch in dieser experimentellen Versuchsreihe wurde sichergestellt, dass potentielle Effekte der anti-Bassoon und anti-Piccolo/Aczonin Antikörper auf die Erkennung des jeweiligen endogenen Epitops durch den Primärantikörper zurückzuführen sind und nicht durch die Anwesenheit von IgG *per se* ausgelöst wurden. Dazu wurde zusätzlich für jede Spermienpräparation der Akrosomreaktionsindex von Spermienproben ermittelt, die lediglich mit Kaninchen IgGs vorinkubiert worden waren. Die gemittelten Daten dieser Kontrollen zeigen, dass eine Inkubation mit Kaninchenantikörpern *per se* im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 6.2C, [Calcium]: 100 %) keinen signifikanten Einfluss auf die Calcium-abhängige akrosomale Exozytose hatte (Abbildung 6.2C, [Kaninchen IgG]: $92,45 \pm 20,02 \%$). Betrachtet man vergleichend die Akrosomreaktionsindices der Spermienproben, die mit einem Antikörper gegen eines der beiden CAZ-Proteine vorinkubiert wurden, wird deutlich, dass eine Behandlung der Spermien mit dem anti-Bassoon Antikörper (Abbildung 6.2C, [anti-Bassoon]: $109,84 \pm 23,67 \%$) ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung des Akrosomreaktionsindex im Vergleich zur Calcium-Kontrolle führte. Im Gegensatz dazu wiesen die mit dem anti-Piccolo/Aczonin Antikörper vorinkubierten Spermien eine Reduzierung des akrosomalen Exozytoseindex um ca. 65 % auf (Abbildung 6.2C, [anti-Piccolo]: $35,07 \pm 16,17 \%$), wobei die Daten sowohl im Vergleich zur Positivkontrolle (p:0,007) als auch im Vergleich zur Kaninchen IgG-Kontrolle (p: 0,020)

eine statistische Signifikanz aufwiesen. Die statistische Signifikanz der Reduzierung der Akrosomreaktionsraten nach Behandlung der Spermien mit dem anti-Piccolo/Aczonin Antikörper ist dabei auch ohne vorherige Umrechnung in den akrosomalen Exozytoseindex, im Vergleich zur Positivkontrolle ($p:0,040$) sowie zur Kaninchen IgG-Kontrolle ($p: 0,012$), gegeben. Diese inhibitorische Wirkung des anti-Piccolo/Aczonin Antikörpers auf die akrosomale Exozytose wurde durch eine vorherige Neutralisation des Antikörpers mit seinem immunogenen Protein fast vollständig aufgehoben (Abbildung 6.2C, [anti-Piccolo + BP]: $82,53 \pm 14,57 \%$). Diese Beobachtung unterstreicht die Spezifität des registrierten inhibitorischen Effektes und die daraus abzuleitende funktionelle Rolle von Piccolo/Aczonin bei der durch Calcium vermittelten SNARE-Aktivierung.

In den hier zusammengefassten Versuchsreihen konnte für einen anti-Piccolo/Aczonin Antikörper, der an die C-terminale Region des CAZ-Proteins bindet, beobachtet werden, dass selektiv die Calcium-abhängige, nicht jedoch die spontane akrosomale Exozytose in Mausspermien inhibiert wurde. Obwohl das Multidomänenprotein Bassoon genauso wie Piccolo/Aczonin im akrosomalen Bereich der Mausspermien lokalisiert ist, zeigte der anti-Bassoon Antikörper aber weder einen Effekt auf die spontane noch auf die durch Calcium ausgelöste Akrosomreaktion. Daher bleibt die funktionelle Bedeutung von Bassoon in Spermien unklar.

6.1.3 Immunoblot-Analyse zum Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in isolierten Rattenspermien

Bassoon und Piccolo/Aczonin sind Gerüstproteine, die zwar aus vielen Protein-Protein-Interaktionsdomänen aufgebaut sind, selbst aber keine katalytische Aktivität aufweisen (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998; Fenster, Chung et al. 2000; Abbildung 3.10). Daraus ergibt sich die These, dass ihre funktionelle Beteiligung an der akrosomalen Exozytose durch die Interaktion und Rekrutierung von an der Akrosomreaktion beteiligten Komponenten vermittelt wird. Interessanterweise werden die für die *Zona pellucida*-Erkennung verantwortlichen Moleküle, auch wenn sie bisher nur zum Teil identifiziert werden konnten (van Gestel, Brewis et al. 2007), in spezialisierten Membranmikrodomänen, den Membranflöschchen oder *membrane rafts* (Pike 2006), an der Stelle der initialen Spermien-*Zona pellucida*-Interaktion konzentriert (Boerke, Tsai et al. 2008; Nixon, Bielnowicz et al. 2009; Kawano, Yoshida et al. 2011). Das Gleiche gilt auch für die Komponenten des SNARE-Fusionsapparates selbst. Dieses subzelluläre Ordnungsprinzip wurde jedoch nicht nur in Spermien beobachtet (Travis, Merdushev et al. 2001; Tsai, De Vries et al. 2007), sondern besteht auch in Neuronen (Lang 2007). Die beschriebenen dynamischen Membran-Plattformen sind durch eine einzigartige Lipidkomposition gekennzeichnet (Pike 2006), welche besonders reich an Cholesterin- und Sphingolipid-Molekülen ist. Die

Zusammensetzung dieser *membrane rafts* gewährleistet eine höhere Organisationsstruktur gegenüber der Lipidumgebung der übrigen Plasmamembran (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002). Da für Piccolo/Aczonin in endokrinen Zellen bereits gezeigt werden konnte, dass es in solchen *membrane rafts* lokalisiert ist (Jacobo, Guerra et al. 2009), sollte untersucht werden, ob Piccolo/Aczonin und/oder Bassoon auch in Spermien eine ähnliche Assoziation an spezialisierte Membranmikrodomänen eingehen.

Aufgrund ihres hohen Cholesteringehalts besitzen *membrane rafts* eine geringere spezifische Dichte als die sie umgebenden Membranbereiche. Folglich ist es experimentell möglich, diese durch Schichtung unter einen Saccharosegradienten während einer Dichtegradientenzentrifugation aufwärts migrieren zu lassen (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002). Da Cholesterin-arme Membranareale nach der Zentrifugation auch weiterhin in den im unteren Teil des Gradienten befindlichen Fraktionen verbleiben, lassen sich *membrane rafts* so gezielt anreichern (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002; Jacobo, Guerra et al. 2009). Dieses im Dichtegradienten aufwärts „schwimmende“ Verhalten, das namensgebend für die Membranflöschchen war (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002), ist sowohl ein Charakteristikum der klassischen, planaren Membranmikrodomänen (Pike 2006) als auch der Flaschen-förmig eingestülpten *Caveolae*, die eine morphologische Untergruppe der *membrane rafts* darstellen (Simons und Ikonen 1997; Ostrom und Liu 2007). Mit Hilfe spezieller Markerproteine der *Caveolae*, den sogenannten Caveolin-Proteinen (Williams und Lisanti 2004; Ostrom und Liu 2007), lässt sich die erfolgreiche Aufreinigung von *Caveolae*-haltigen *membrane rafts* leicht im Immunoblot überprüfen (Song, Li et al. 1996).

Für Spermien hat sich allerdings gezeigt, dass diese Art der fraktionellen Zentrifugation über einen Dichtegradienten nicht zu einer erfolgreichen Anreicherung von Caveolin-haltigen Fraktionen führt (Travis, Merdushev et al. 2001; Ackermann, Zitanski et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf die Behandlung von Membrangesamtfractionen mit eiskalten, nicht-ionischen Detergenzien (Shogomori und Brown 2003) als Methode zur Anreicherung von *membrane rafts* zurückgegriffen (Travis, Merdushev et al. 2001; Ackermann, Zitanski et al. 2008; Tsai, Brewis et al. 2012). Die Unlöslichkeit der *membrane rafts* in nicht-ionischen Detergenzien (bei 4 °C) wie z. B. Triton X-100 (Simons und Ikonen 1997), erlaubt eine Präzipitation der Detergens-resistenten Membranfraktionen (DRM-Fractionen) (Simons und Ikonen 1997; Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002). Zur Überprüfung dieser Methode dient ebenfalls der Nachweis einer Anreicherung von Caveolin-Proteinen in den DRM-Fractionen (Travis, Merdushev et al. 2001). Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass während der Prozedur der Extraktion mit Triton X-100 eine mögliche „Umorganisation“ der unter physiologischen Bedingungen existierenden Zusammensetzung von DRMs erfolgen kann (Munro 2003). Der Nachweis von Proteinen

in DRM-Fractionen kann daher nicht als „Gold-Standard“ für eine tatsächlich in der Zelle vorkommende *membrane raft*-Assoziation gewertet werden (Shogomori und Brown 2003; Pike 2006).

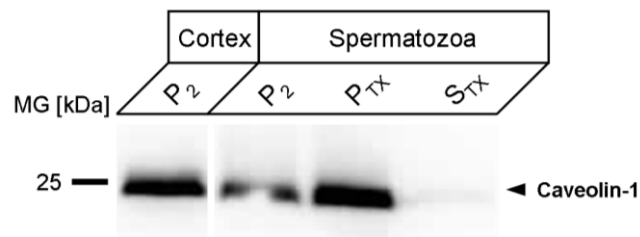


Abbildung 6.3: Verteilung des Caveolin-1-Proteins in den Membransubfraktionen von Rattenspermien.

Zur Kontrolle der Anreicherung der verschiedenen Membransubfraktionen wurden gleiche Proteinmengen der parallel aus Großhirnrinde [Cortex] und Spermien [Spermatozoa] der Ratte isolierten Membranausgangsfraction [P_2], der in eiskaltem Triton X-100 gelösten Membranbestandteile [S_{TX}] und der nicht solubilisierten Präzipitate [P_{TX}] im Immunoblot mit Hilfe eines Antikörpers analysiert, der das *Caveolae*-Markerprotein Caveolin-1 detektiert. Dabei fällt auf, dass die P_2 -Fraktion und die P_{TX} -Fraktion der Spermien beide eine Caveolin-1-immunreaktive Bande aufwiesen, die in der molekularen Masse mit der im Cortex detektierten Bande übereinstimmte, wohingegen in der S_{TX} -Fraktion kaum eine Caveolin-Immunmarkierung beobachtet werden konnte. Die im Vergleich zur P_2 -Fraktion deutlich intensivere Caveolin-1-Immunreaktivität der DRM-Fraktion der Spermien belegt zudem eine Anreicherung von Caveolin-1 in der P_{TX} -Fraktion. Der Immunoblot zeigt die Verteilung der Caveolin-1-Immunreaktivität in den in Abbildung 6.4 analysierten Membransubfraktionen. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; der Pfeil auf der rechten Seite deutet die molekulare Größe des Caveolin-1-Proteins an.

Um zu überprüfen, ob Bassoon und Piccolo/Aczonin in Spermien analog zu den SNARE-Proteinen (Travis, Merdushev et al. 2001; Tsai, De Vries et al. 2007) und *Zona pellucida*-Erkennungsmolekülen (Boerke, Tsai et al. 2008; Nixon, Bielanowicz et al. 2009; Kawano, Yoshida et al. 2011) in DRMs lokalisiert sind, wurden zunächst Membranfraktionen aus Spermien durch differentielle Zentrifugation hergestellt, die anschließend einer Extraktion mit eiskaltem Triton X-100 unterzogen wurden (s. Abschnitt 5.2.1.4). Die erfolgreiche Anreicherung Caveolin-1 enthaltender DRMs wurde verifiziert, indem gleiche Proteinmengen des Membranausgangsmaterials (P_2), der in Triton X-100 gelösten Membranbestandteile (S_{TX}) und der präzipitierten DRM-Fraktion (P_{TX}) im Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Caveolin-1 (Travis, Merdushev et al. 2001) auf die Verteilung der Caveolin-Immunreaktivität hin untersucht wurden. In der P_2 - und in der P_{TX} -Fraktion der Rattenspermien wurde eine immunreaktive Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 24 kDa von dem anti-Caveolin-1 Antikörper detektiert (Abbildung 6.3, [Spermatozoa]). Diese Masse entspricht dem apparenten Molekulargewicht von Caveolin-1 in Immunoblots von Rattencortex-Membranfraktionen (Abbildung 6.3, [Cortex]) und von Mausspermienproben (Travis, Merdushev et al. 2001). Dagegen war in der Fraktion der Triton X-100-löslichen Membrankomponenten kaum eine Caveolin-1-Immunmarkierung zu erkennen (Abbildung 6.3, [Spermatozoa, S_{TX}]). Außerdem war zu beobachten, dass die Caveolin-1-Immunreaktivität in der P_{TX} -Fraktion im Vergleich zur P_2 -Fraktion der Spermien bei gleicher Proteinmenge deutlich stärker

war (Abbildung 6.3, [Spermatozoa]). Daher kann von einer Anreicherung Caveolin-1 enthaltender *membrane rafts* durch die Triton X-100-Extraktion ausgegangen werden. Anschließend wurde die Verteilung der beiden großen Multidomänenproteine Bassoon und Piccolo/Aczonin in den erfolgreich separierten Membransubfraktionen im Immunoblot analysiert. Die Vielfalt der Interaktionsdomänen von Bassoon und Piccolo/Aczonin bietet zwar besonders viele Interaktionsmöglichkeiten für die Komponenten der akrosomalen Exozytose – die sich daraus ergebende sehr große molekulare Masse von Bassoon (> 400 kDa; tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998) und Piccolo/Aczonin (> 500 kDa; Fenster, Chung et al. 2000) ist jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten beim direkten biochemischen Nachweis der beiden endogenen Proteine verbunden (Sudhof 2012). Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene methodische Ansätze verfolgt, um einen Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in Membranfraktionen von Spermien mit Hilfe der Immunoblot-Technik zu versuchen.

Dazu wurde zum einen an der Optimierung der Trennung von Membranproteinen im SDS-PAGE-Gel und zum anderen an verschiedenen Immunoblot-Verfahren gearbeitet. Die Auftrennung der Membranfraktionen des Cortex und der Spermien in der Gelelektrophorese sowohl mit Hilfe selbst hergestellter SDS-PAGE-Gele als auch mittels nach Herstellerangaben verwendeter Novex NuPage Gradientengele (Life Technologies, Carlsbad, USA, s. 4.7) zeigte trotzdem nur eine geringe Trennschärfe der hochmolekularen Proteine. Mit den verschiedenen Immunoblot-Verfahren, die im Anschluss an die Gelelektrophorese ausgetestet wurden, wie dem *Semi-dry* Transfersystem in Kombination mit starkem Druck oder dem *Wet-Blot* System, konnten leider auch nur bedingt evaluierbare Immunoblot-Ergebnisse erzielt werden.

Abbildung 6.4 zeigt dennoch exemplarisch einen ausgewählten Immunoblot dieser methodischen Ansätze. Der anti-Bassoon Antikörper demonstrierte aufgrund der geringen Trennschärfe der SDS-PAGE eine diffuse Immunmarkierung sowohl der Cortex- als auch der Spermien-Membranfraktion (Abbildung 6.4, [Cortex, P₂], [Spermatozoa, P₂]). Dennoch deutete sich eine Assoziation der Bassoon-Immunreaktivität an die DRM-Fraktion der Rattenspermien an (Abbildung 6.4, [Spermatozoa, P_{TX}]). Im Gegensatz dazu wies die Fraktion der Triton X-100-löslichen Membrankomponenten (S_{TX}) keine Bassoon-Immunreaktivität auf. Untersuchungen derselben Fraktionen im Immunoblot mit Hilfe eines anti-Piccolo/Aczonin Antikörpers ergaben ebenfalls nur eine diffuse Immunreaktivität (nicht gezeigt). Dieses Signal ließ zwar nicht eindeutig eine Assoziation von Piccolo/Aczonin an eine der Membransubfraktionen erkennen, deutet aber grundsätzlich auf eine Piccolo/Aczonin-Immunmarkierung in den Spermienfraktionen hin.

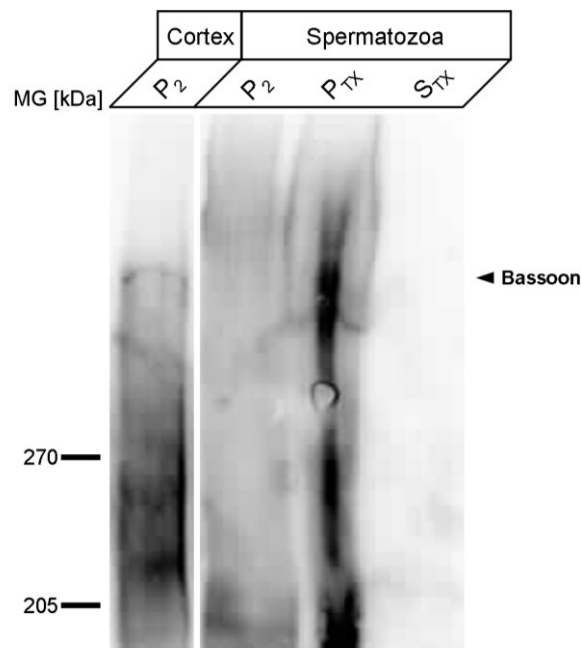


Abbildung 6.4: Immunoblot-Analysen von Bassoon in Membranfraktionen des Cortex und isolierter Spermien der Ratte.

Zum Vergleich des Molekulargewichtes des Bassoon-Proteins in Neuronen und Spermien wurden parallel aus Großhirnrinde [Cortex] und Spermien [Spermatozoa] der Ratte isolierte Membranfraktionen im Immunoblot analysiert. Die Assoziation von Bassoon an Detergens-unlösliche Membrankomponenten in Spermien wurde ebenfalls im Immunoblot überprüft, wobei gleiche Proteinmengen der aus epididymalen Rattenspermien gewonnenen Membranausgangsfraction [P_v], der in eiskaltem Triton X-100 extrahierten Membranbestandteile [S_v] und der DRM-Fraktion [P_v] analysiert wurden. Der Nachweis des Bassoon-Proteins in der Membranfraktion des Cortex ergab eine schwach immunreaktive Bande, die in etwa dem Molekulargewicht von Bassoon (> 400 kDa) entsprechen könnte, auch wenn die aus der langen Laufzeit resultierende mangelnde Trennschärfe der SDS-PAGE die Zuordnung erschwert. In den Fraktionen der Rattenspermien reichte die geringe Trennschärfe der SDS-PAGE jedoch nicht für eine eindeutige Zuordnung des Molekulargewichtes aus; eine diffuse Bassoon-Immunreaktivität in der DRM-Fraktion der Spermien konnte dennoch beobachtet werden. Der gezeigte Immunoblot ist eine ausgewählte Abbildung aus mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; der Pfeil auf der rechten Seite deutet in etwa die molekulare Größe des Bassoon-Proteins an.

Auch in den wenigen in der Literatur dokumentierten Immunoblot-Analysen von endogenem Bassoon und Piccolo/Aczonin in Membranfraktionen des Gehirns ist lediglich eine diffuse Markierung erkennbar. Zur Verdeutlichung dieser technischen Problematik des biochemischen Nachweises beider CAZ-Proteine wurden Immunoblots aus einer Arbeit von Susanne tom Dieck eingefügt, bei denen ein immunologischer Nachweis von Bassoon (Abbildung 6.5, oberer Immunoblot) und Piccolo/Aczonin (unterer Immunoblot) in verschiedenen Proben des Rattenenzephalons gezeigt werden (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998). Im Gegensatz zu Spermien machen in Neuronen die Proteine, die in den prä- und/oder postsynaptischen Spezialisierungen angereichert sind, wie z. B. die CAZ-Proteine, im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Neurone einen erheblichen Anteil aus (Li, Hornshaw et al. 2004; Selimi, Cristea et al. 2009; Kantardzhieva, Peppi et al. 2012). In reifen Spermien hingegen kommt zum einen erschwerend hinzu, dass kaum Proteinbiosynthese stattfindet (Darszon, Nishigaki et al. 2011). Außerdem entfällt ein hoher Anteil der ca. 2000 bisher identifizierten Proteine des humanen Spermienproteoms (Baker, Reeves et al. 2007) auf die Hauptbestandteile der beiden Spermienkompartimente: den Nukleus (Baker, Reeves et

al. 2007; Oliva, de Mateo et al. 2009; Zitranski, Borth et al. 2010) und das Axonem (Inaba 2003; Baker, Reeves et al. 2007; Oliva, de Mateo et al. 2009). Darüber hinaus dominieren im Spermienproteom die mitochondrialen Proteine des Mittelstücks, die zur Bereitstellung des hohen Energiebedarfs der motilen Spermien notwendig sind (Martinez-Heredia, Estanyol et al. 2006; Baker, Reeves et al. 2007; Oliva, de Mateo et al. 2009). Gerüstproteine und/oder regulatorische Proteine können daher im Vergleich zum Gesamtprotein der Spermien nur eine kleine Untergruppe darstellen. Da die technischen Probleme des Immunoblot-Nachweises von Bassoon und Piccolo/Aczonin bereits bei der großen Menge der beiden CAZ-Proteine im Verhältnis zum Gesamtproteom von Neuronen auftreten (Abbildung 6.5), war ein eindeutiger Nachweis von Bassoon und Piccolo/Aczonin in Spermien kaum zu erwarten. Analog konnten das Bassoon- und Piccolo/Aczonin-Protein auch in massenspektrometrischen Analysen von Spermien bislang nicht identifiziert werden (Baker, Reeves et al. 2007). Die limitierte Sensitivität der Massenspektrometrie-Technik bei geringem Signal/Hintergrund-Verhältnis erschwert dabei den Nachweis noch zusätzlich (Kaiser, Meierhofer et al. 2008).

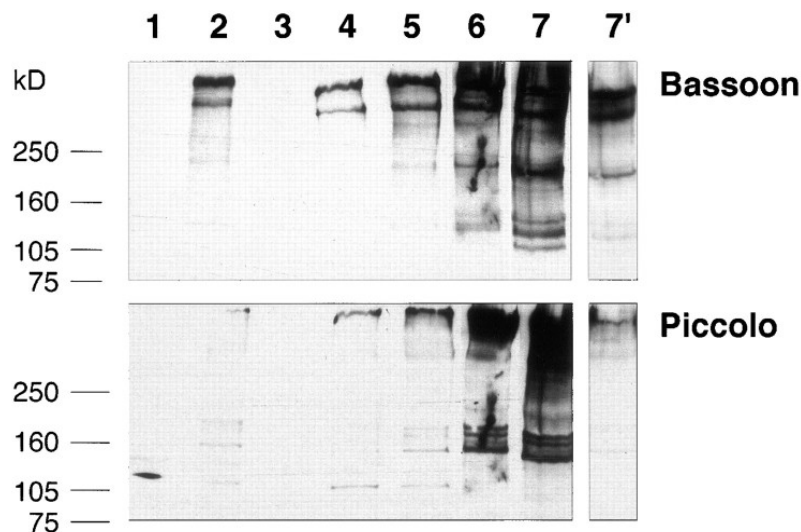


Abbildung 6.5: „Bassoon ist in Präparationen synaptischer Proteine angereichert“ (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998).

Zur Veranschaulichung der Problematik des Immunoblot-Nachweises von Bassoon und Piccolo/Aczonin wurde eine Abbildung aus tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998 eingefügt: „Die Präparation der synaptischen Proteine aus Rattenenzephalon erfolgte nach Carlin, Grab et al. 1980. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen der Fraktion löslicher Proteine [1], der Membranfraktion P₂ [2], der Myelinfraktion [3], der Fraktion leichter Membranen [4], der Synaptosomenfraktion [5], der Detergens-extrahierten Synaptosomenfraktion [6] und der *postsynaptic density* (PSD)-Fraktion [7], die sowohl Elemente der postsynaptischen als auch der präsynaptischen Spezialisierung enthält, im Immunoblot analysiert. [7'] zeigt eine kürzere Belichtung von [7]. Zwei prädominante Bassoon-immunreaktive Banden von 420 kDa und 350 kDa und mehrere putative Proteolyseprodukte sind in der PSD-Fraktion angereichert. Zum Vergleich wurde das Piccolo/Aczonin-Protein mit Hilfe eines anti-Piccolo Antikörpers im Immunoblot nach dem Entfernen des anti-Bassoon Antikörpers auf derselben Nitrozellulosemembran nachgewiesen. Die molekulare Masse der Markerproteine ist in kDa angegeben.“

Neben den oben beschriebenen technischen Problemen des Nachweises hochmolekularer Proteine ist bereits für Proteine deutlich geringeren Molekulargewichtes dokumentiert, dass die Sensitivität des Immunoblot-Nachweises

speziell in Spermien gering ist und daher hohe Proteinmengen benötigt werden (Brugnon, Pons-Rejraji et al. 2012). Für die CAZ-Proteine Bassoon und Piccolo/Aczonin reicht der geringe Proteingehalt der Spermienfraktionen offensichtlich nicht für einen eindeutigen Immunoblot-Nachweis aus. Eine Assoziation der beiden riesigen Multidomänenproteine an DRMs in Spermien kann daher nur vermutet werden.

6.2 Identifikation von Munc13-Subtypen im männlichen Reproduktionssystem von Nagern und ihre Bedeutung für die Akrosomreaktion

Nachdem die beiden „Giganten“ unter den CAZ-Proteinen erstmalig im Akrosom von Spermien nachgewiesen werden konnten (Abbildung 6.1), stellte sich die Frage, ob noch weitere Gerüstproteine des CAZ-Netzwerkes in Nagerspermien exprimiert werden und welche subzelluläre Lokalisation diese aufweisen. Ein Gerüstprotein, mit dessen N-Terminus sowohl neuronales Bassoon und Piccolo/Aczonin als auch die CAZ-Proteine RIM und ELKS/ERC (s. Abschnitt 3.2.2) interagieren, ist das Munc13-1-Protein (Wang, Hu et al. 2009). Im Folgenden wurde untersucht, ob Munc13 und ggf. auch welche Isoform von Munc13 im männlichen Reproduktionsgewebe und in isolierten epididymalen Spermien von Ratten und Mäusen exprimiert wird.

6.2.1 Immunoblot-Analysen zur Expression von Munc13 in männlichen Reproduktionsorganen und Spermien

In Vertebraten sind insgesamt fünf verschiedene Munc13-Proteine identifiziert worden (Abbildung 6.6). Der Struktur-Vergleich dieser fünf Subtypen verdeutlicht, dass nur zwei Isoformen – Munc13-1 sowie die ubiquitär exprimierte *Splice*-Variante von Munc13-2 (ubMunc13-2) – am N-Terminus eine zusätzliche C2A-Domäne besitzen (Abbildung 6.6), die sie zur Interaktion mit RIM-Proteinen befähigt (Koch, Hofmann et al. 2000; Betz, Thakur et al. 2001). Eine Interaktion mit anderen CAZ-Proteinen wie Bassoon, Piccolo/Aczonin und ELKS/ERC konnte jedoch bisher nur für das Munc13-1-Protein gezeigt werden (Wang, Hu et al. 2009). Aufgrund des erhöhten Bindungspotentials von Munc13-1 und ubMunc13-2 mit anderen CAZ-Proteinen wurde als erstes geprüft, ob diese in männlichem Reproduktionsgewebe bzw. epididymalen Spermien exprimiert werden.

Dazu wurde ein polyklonaler anti-Munc13-N_{abc} Antikörper in Immunoblotanalysen eingesetzt, der spezifisch an die Aminosäuren 150 bis 250 des N-Terminus von Munc13-1 bindet (s. 4.4.1, Abbildung 6.12A). Aufgrund der ausgeprägten Homologie der N-Termini von Munc13-1 (accession number U24070) und ubMunc13-2 (accession number AF159706, 51 % Homologie in den N-terminalen 400 Aminosäuren, 62 % identische Aminosäuren im Bereich des Antigenepitops; Betz, Thakur et al. 2001) ist es sehr wahrscheinlich, dass der Antikörper auch die 112 Aminosäuren (ca. 12 kDa, Abbildung 6.6) kürzere ubMunc13-2-Isoform bindet. Für andere Antikörper, die auch den N-Terminus von Munc13-1 erkennen, wurde diese Kreuzreaktivität bereits gezeigt (Limbach, Laue et al. 2011).

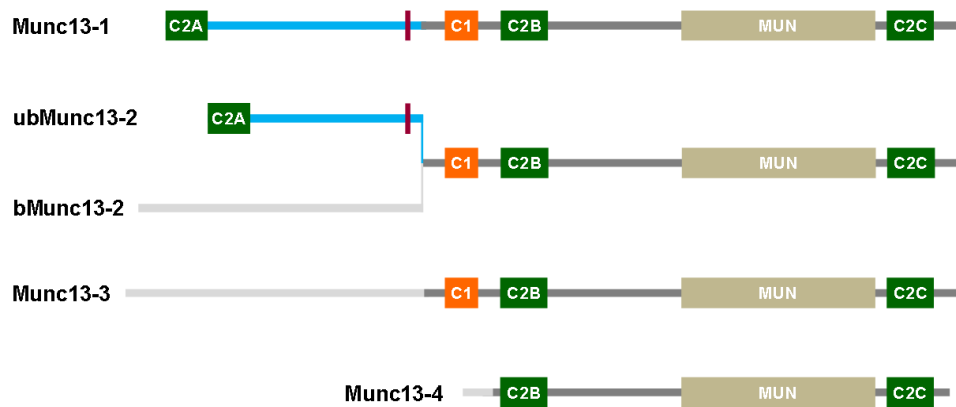


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Munc13-Proteine.

Der Strukturvergleich der fünf Munc13-Proteine zeigt, dass alle Munc13-Proteine eine konservierte C-terminal lokalisierte Munc-Homologie-Domäne (MUN, khakifarben) sowie zwei die MUN-Domäne flankierende C2-Domänen (C2B und C2C, grün) besitzen. Während die N-Termini der Gehirn-spezifischen *Splice*-Variante von Munc13-2 (bMunc13-2) sowie der Isoformen Munc13-3 und -4 untereinander stark divergieren (markiert durch schmale hellgraue Balken), besitzen die N-Termini von Munc13-1 und der ubiquitär exprimierten *Splice*-Variante von Munc13-2 (ubMunc13-2) einen zu 51 % homologen N-Terminus (markiert durch schmale blaue Balken), der am N-terminalen Ende durch eine zusätzliche C2-Domäne (C2A) erweitert ist (Betz, Thakur et al. 2001). Strukturelle Domänen sind als Quader dargestellt, das Polypeptidrückgrat ist durch verschiedenfarbige schmale Balken wiedergegeben. C1: C1-Domäne, roter Längsstreifen: Calmodulin-Bindestelle.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich das Expressionsprofil beider zu analysierenden Munc13-Isoformen während der Spermienentwicklung verändert. Dazu wurde bestimmt, inwieweit sich die Intensität der Immunreaktivität des anti-Munc13-N_{abc} Antikörpers zwischen Membranfraktionen unterscheidet, die aus Keimzellgewebe mit Spermien verschiedener Reifungsstadien isoliert wurden. Dazu wurde zum einen Hodengewebe verwendet, in dem die Spermatogenese stattfindet und das daher sowohl Spermiovorläuferzellen als auch bereits differenzierte Spermatozoen enthält (s. Abschnitt 6.3.6.1). Parallel dazu wurde Nebenhodengewebe analysiert, in dem die Spermatozoen bis zur Ejakulation weitere Reifungsschritte durchlaufen. Darüber hinaus wurden schließlich motile, reife, epididymale Spermien im Immunoblot auf die Expression der Munc13-Proteine hin überprüft. Für die Zuordnung des Molekulargewichtes der im Immunoblot detektierten immunreaktiven Banden wurden als Positivkontrolle aus Rattengehirn isolierte Membranfraktionen analysiert (Abbildung 6.7, [Enzephalon]), in dem sowohl Munc13-1 als auch ubMunc13-2 bereits nachgewiesen wurden (Varoqueaux, Sons et al. 2005).

Mit dem anti-Munc13-N_{abc} Antikörper konnten in der Membranfraktion des Rattengehirns drei immunreaktive Banden detektiert werden (Abbildung 6.7A). Die Bande mit der größten molekularen Masse kann der Munc13-1-Isoform zugeordnet werden (196 kDa, U24070; Brose, Hofmann et al. 1995). Die molekulare Masse einer weniger stark immunmarkierten Bande von ca. 180 kDa entspricht in etwa dem Molekulargewicht der ubMunc13-2 *Splice*-Variante (184 kDa, AF159706; Betz, Thakur et al. 2001). Die dritte reaktive Bande kann aufgrund des abgeleiteten Molekulargewichts von ca. 150 kDa keiner der Munc13-Isoformen zugeordnet werden und ist daher eher

auf ein Degradationsprodukt einer der beiden detektierten Munc13-Proteine zurückzuführen (Augustin, Betz et al. 1999; Dulubova, Lou et al. 2005).

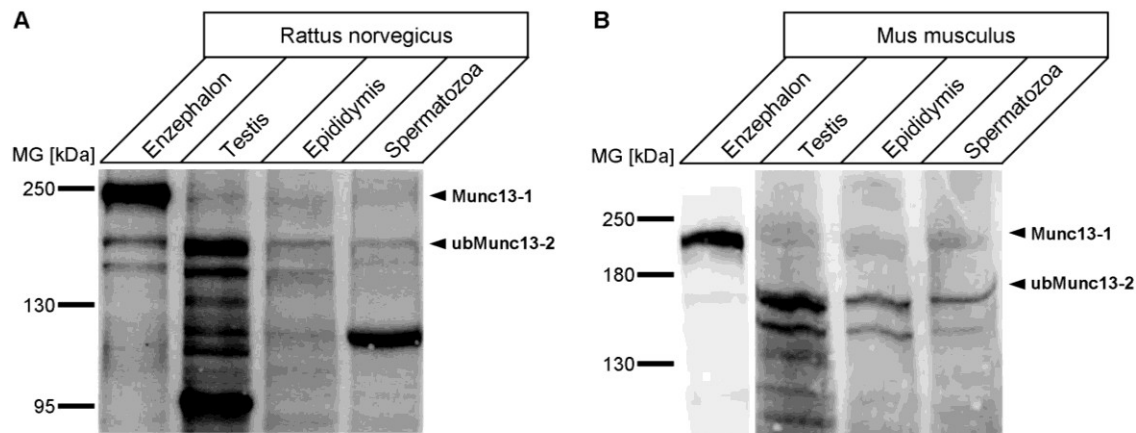


Abbildung 6.7: Expression von Munc13-Subtypen im männlichen Reproduktionsgewebe und in epididymalen Spermien von Nagern.

[A] Zur Überprüfung der Expression verschiedener Subtypen von Munc13 in männlichen Keimdrüsen im Vergleich zu neuronalem Gewebe wurden Membranfraktionen aus Gehirn [Enzephalon], Hoden [Testis], Nebenhoden [Epididymis] und epididymalen Spermien [Spermatozoa] der Ratte mit Hilfe der Immunoblot-Technik analysiert. Dabei wurde die jeweilige zur Trennung aufgetragene Proteinmenge der einzelnen Proben variiert, um in allen Proben gleichzeitig ein Immunsignal detektieren zu können und so eine direkte Zuordnung des Molekulargewichts der Munc13-Proteine in derselben Immunoblot-Analyse zu ermöglichen. Der für die Detektion verwendete anti-Munc13-N_{trk}-Antikörper erkennt ein N-terminales Epitop von Munc13-1 und weist daher zum homologen N-Terminus von ubMunc13-2 vermutlich eine Kreuzreaktivität auf (Limbach, Laue et al. 2011). Betrachtet man die Enzephalon-Fraktion, so fällt auf, dass der anti-Munc13-N_{trk}-Antikörper mehrere immunreaktive Banden detektiert, wobei die mit der größten molekularen Masse zugleich die stärkste Immunreaktivität aufwies und aufgrund ihres Molekulargewichts der Munc13-1-Isoform zugeordnet werden kann. Die nächst kleinere und zudem deutlich schwächere immunreaktive Bande entspricht in etwa dem Molekulargewicht von ubMunc13-2 von 184 kDa. In der analysierten Membranfraktion des Hodens war die Munc13-1-Immunreaktivität kaum zu registrieren, wohingegen eine ausgeprägte ubMunc13-2-Immunreaktivität zu erkennen war. Außerdem wurden im Vergleich zur Enzephalon-Membranfraktion wesentlich mehr potentielle Degradationsprodukte detektiert. Darüber hinaus fällt auf, dass die ubMunc13-2 *Splice*-Variante auch in den Nebenhoden-Membranfraktionen und den Membranfraktionen der epididymalen Spermien die prädominante Munc13-Isoform zu sein scheint, wohingegen eine Markierung der Munc13-1-Isoform in den reifen Spermien kaum auszumachen ist.

[B] Analog hergestellte und analysierte Membranfraktionen aus entsprechenden Organen der Maus zeigten ein ganz ähnliches Expressionsprofil der Munc13-Isoformen: Während im Enzephalon vor allem die Munc13-1-Isoform nachzuweisen war, war im Reproduktionsgewebe in allen Stadien der Spermienreifung [Testis, Epididymis] bis hin zu den ausgereiften motilen epididymalen Spermien [Spermatozoa] vorwiegend die ubMunc13-2-Isoform mit dem anti-Munc13-N_{trk}-Antikörper zu detektieren. Die durch eine vertikale weiße Linie abgegrenzten Spuren befanden sich auf demselben Nitrozellulosebogen, wurden bei der Detektion jedoch unterschiedlich langen Expositionszeiten ausgesetzt.

Das Molekulargewicht in kDa ist für den jeweiligen Immunoblot links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite der Immunoblots markieren die erwartete apparente molekulare Masse der beiden Munc13-Isoformen. Die ausgewählten Immunoblots zeigen repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Gewebepreparationen.

Betrachtet man nun im Vergleich dazu die testikuläre Membranfraktion (Abbildung 6.7A, [Testis]), so waren zum einen deutlich mehr potentielle Degradationsprodukte auszumachen als in der Enzephalon-Membranfraktion. Zum anderen war ein im Vergleich zur analysierten Gehirn-Membranprobe genau entgegengesetztes Verhältnis der Immunintensitäten der Munc13-1- und ubMunc13-2-Proteine zu beobachten. In der Membranfraktion des Rattenhodengewebes war ein sehr starkes Immunsignal zu detektieren, das der molekularen Masse der ubMunc13-2 *Splice*-Variante entspricht, wohingegen nur eine sehr schwache Munc13-1-Immunmarkierung auszumachen war.

In weiterführenden massenspektrometrischen Analysen von Hodenproben, die in einem späteren Kapitel dieser Arbeit vorgestellt werden (Abschnitt 6.3.7.1), konnte diese Beobachtung einer verstärkten ubMunc13-2-Expression im Hoden bestätigt werden: Nach tryptischem Verdau von aus Hodengewebe hergestellten Immunpräzipitationsproben zeigten Sequenzvergleiche von massenspektrometrischen Analysen der erhaltenen Peptide, dass lediglich Munc13-2-Peptide nachzuweisen waren (Tabelle 6.2). Im Gegensatz dazu konnten Peptide des Munc13-1-Proteins nicht detektiert werden konnten. Um genauer eingrenzen zu können, welche *Splice*-Variante des Munc13-2-Proteins identifiziert wurde, ist eine Betrachtung der Peptide des N-Terminus von bMunc13-2 und ubMunc13-2 notwendig. Die C-Termini der beiden Munc13-2 *Splice*-Varianten stimmen zu 100 % überein (Betz, Thakur et al. 2001; Abbildung 6.6) und sind damit zur Unterscheidung der *Splice*-Varianten nicht geeignet. Abbildung 6.8 zeigt die Position aller identifizierten Munc13-2-Peptide (gelb unterlegt) innerhalb der gesamten Primärsequenz von ubMunc13-2. Dabei wird deutlich, dass die N-terminalen Peptide ausschließlich der ubMunc13-2-Isoform zugeordnet werden konnten, wohingegen bMunc13-2-Peptide nicht nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse untermauern die im Immunoblot beobachtete Expression (Abbildung 6.7) der ubMunc13-2 *Splice*-Variante im Testis von Ratten.

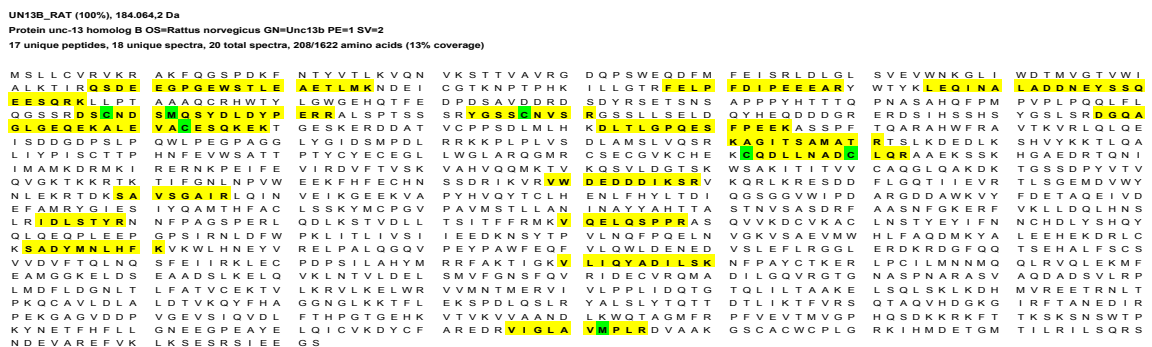


Abbildung 6.8: Identifizierte Peptide des ubMunc13-2-Proteins (Unc-13 Homolog B) in der massenspektrometrischen Analyse von Testis-Immunpräzipitationen.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des ubMunc13-2-Proteins vom N- zum C-Terminus. Die Peptide, die nach dem tryptischen Verdau in der massenspektrometrischen Analyse von Hodengewebeproben identifiziert wurden, sind gelb unterlegt. Zusammengefasst decken sie 13 % der Aminosäuresequenz des ubMunc13-2-Proteins ab. Diese Darstellung veranschaulicht außerdem, dass sowohl Peptide des gemeinsamen C-Terminus von ubMunc13-2 und bMunc13-2 als auch des N-Terminus von ubMunc13-2 detektiert wurden, sodass die Gesamtheit der identifizierten Peptide eindeutig die Expression der ubMunc13-2 *Splice*-Variante belegt. Abgebildet ist ein Auszug aus der Scaffold Software (Proteome Software Inc., Portland, USA). Bei der Analyse zugelassene Aminosäuremodifikationen (s. 5.2.5.4) sind grün unterlegt.

Nachdem das starke Immunsignal im Hodengewebe der Expression einer ubMunc13-2 *Splice*-Variante zugeordnet werden konnte, wurde die Munc13-Expression auch in den Geweben betrachtet, in denen sich ein größerer Anteil reifer Spermien befindet. Im Immunoblot konnte in der Membranfraktion des Nebenhodens ebenfalls hauptsächlich eine ubMunc13-2-immunreaktive Bande durch den anti-Munc13-N_{abc} Antikörper detektiert werden (Abbildung 6.7A, [Epididymis]). Ein Munc13-1-Immunsignal war

dagegen kaum auszumachen. Genauso wiesen motile, epididymale Rattenspermien kaum eine Munc13-1-Markierung, jedoch ein Immunsignal der ubMunc13-2 *Splice*-Variante auf (Abbildung 6.7A, [Spermatozoa]). Die ubMunc13-2 *Splice*-Variante ist demnach gegenüber Munc13-1 in allen Abschnitten des Reproduktionssystems von Ratten die prädominante Munc13-Isoform.

Um zu überprüfen, ob die Expression von ubMunc13-2 im Reproduktionssystem auch in anderen Nagerspezies zu beobachten ist, wurden analoge Studien mit Mausgewebeproben durchgeführt. Dazu wurden, wie für Abbildung 6.7A beschrieben, Membranfraktionen des Hodens, Nebenhodens sowie reifer Spermien im Immunoblot mit Hilfe des anti-Munc13-N_{abc} Antikörpers analysiert. Parallel dazu wurden auch für diesen experimentellen Ansatz Membranfraktionen des Enzephalons als Referenzgewebe verwendet. Auch diese Analyse erlaubt eine direkte Zuordnung der molekularen Masse der detektierten Munc13-immunreaktiven Banden für diese Spezies. In der Gehirnfraction der Maus wurde, wie im Rattengehirn (Abbildung 6.7A), fast ausschließlich die Munc13-1-Isoform nachgewiesen (Abbildung 6.7B, [Enzephalon]). Ebenfalls analog zu den Rattenproben erwies sich bei der Betrachtung der Hoden-, Nebenhoden- und Spermien-Membranfraktionen der Maus, dass in allen drei Proben vorwiegend ubMunc13-2 detektiert werden konnte (Abbildung 6.7B, [Testis], [Epididymis], [Spermatozoa]).

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Expression der beiden mit RIM-Proteinen interagierenden Munc13-Isoformen festhalten, dass in allen Organen des männlichen Reproduktionssystems beider untersuchten Nagerspezies hauptsächlich die ubMunc13-2 *Splice*-Variante vorkommt. Da das ubMunc13-2-Protein nicht nur während der Keimzellbildung, sondern auch in reifen Spermien exprimiert wird, könnte es in reifen Spermien eine funktionelle Bedeutung haben.

6.2.2 Subzelluläre Lokalisation von Munc13 in Spermien

Um eine mögliche Funktion des in Ratten- und Mausspermien exprimierten ubMunc13-2-Proteins zu identifizieren oder auszuschließen, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von Munc13 in Mausspermien bestimmt (Heydecke, Meyer et al. 2006; Buffone, Ijiri et al. 2012). Dazu wurden isolierte murine Spermien in indirekten immunzytochemischen Färbungen mit dem anti-Munc13-N_{abc} Antikörper inkubiert, der bereits im Immunoblot auf seine Spezifität hin überprüft wurde (Abbildung 6.7). Die Detektion gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch die Oxidation des chromogenen Peroxidase-Substrats DAB in ein braun gefärbtes Phenazinpolymer (Grube 1980), wohingegen der Zellkern mit Hilfe des blauen und damit kontrastfarbigen Farbstoffs Hämalun sichtbar gemacht wurde.

Eine starke Immunmarkierung, die eine Bindung des applizierten Primärantikörpers reflektiert, wurde in den durchgeführten Färbungen vor allem im akrosomalen Bereich

des Spermienkopfes beobachtet (Abbildung 6.9, [Munc13-N_{abc}], Pfeilspitze). Im Flagellum waren hingegen nur schwache braune Immunsignale zu erkennen ([Munc13-N_{abc}], Pfeil). In Kontrollfärbungen, für die der Primärantikörper zur Absättigung seiner Epitop-Bindungsstellen zuvor mit einer fünffachen Menge des entsprechenden immunogenen Peptids neutralisiert worden war (s. Abschnitt 5.2.6.2), wurde keine Reaktivität im akrosomalen Bereich der Spermien detektiert (Abbildung 6.9, [Munc13-N_{abc} + BP], Pfeilspitze). Das schwache Immunsignal des Flagellums hingegen persistierte auch nach der Maskierung des Primärantikörpers durch das immunogene Peptid (Abbildung 6.9, [Munc13-N_{abc} + BP], Pfeil). Folglich kann von einer unspezifischen Färbung des Spermischwanzes, aber einer spezifischen Erkennung des endogenen Munc13-Proteins im akrosomalen Bereich durch den anti-Munc13-N_{abc} Antikörper ausgegangen werden. Kontrollfärbungen, in denen die Spermienpräparate lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, zeigten in keinem der durchgeführten Ansätze eine Immunmarkierung (nicht gezeigt). Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass das Munc13-Protein im akrosomalen Bereich der Spermien lokalisiert ist.

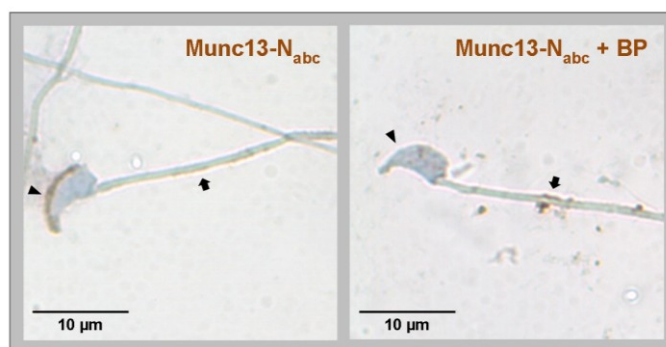


Abbildung 6.9: Subzelluläre Lokalisation von Munc13 in Mausspermien.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Munc13 erfolgte mit Hilfe eines indirekten immunzytochemischen Nachweises an isolierten Balb/C Mausspermien. Gebundener Antikörper ist durch eine Braunfärbung des Chromogens DAB zu erkennen, während die Zellkerne mit Hämalaun komplementär gefärbt wurden (blau). Die Inkubation mit dem anti-Munc13-N_{abc} Antikörper führte zu einer schwachen Markierung des Mittelstücks des Flagellums ([Munc13-N_{abc}], Pfeil) und einer sehr viel intensiveren sichelförmigen Immunmarkierung der akrosomalen Region (Pfeilspitze). Die zum Spezifitätsnachweis der Antikörpermarkierung durchgeführte vorherige Neutralisation des Primärantikörpers mit Hilfe eines fünffachen Überschusses des immunogenen Peptids führte dazu, dass die akrosomale Immunmarkierung nicht mehr zu detektieren war ([Munc13-N_{abc} + BP], Pfeilspitze), wohingegen die schwache Braunfärbung des Flagellums (Pfeil) erhalten blieb. Die Mikrophotografen zeigen eine repräsentative Auswahl aus drei experimentellen Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen.

Da durch die exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Munc13 Rückschlüsse auf dessen mögliche Funktion in Spermien gezogen werden können (Ackermann, Zitrandski et al. 2008; Buffone, Ijiri et al. 2012), wurden Immunogold-Färbungen von Ultradünnschnitten epididymaler Mausspermien, die mit anti-Munc13 Antikörpern behandelt wurden, elektronenmikroskopisch analysiert (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Beate Wilhelm, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg). Der für die Immunoblotanalysen und immunzytochemischen Nachweise verwendete anti-Munc13-N_{abc} Antikörper (Abbildung 6.7 und 6.9) führte in

entsprechenden Immunogold-Färbungen zu keiner eindeutigen Immunmarkierung (nicht gezeigt). Daher wurde in weiterführenden Studien ein anti-Munc13-N_{sysy} Antiserum verwendet, das gegen die Aminosäuren 3 bis 317 des N-Terminus von Munc13-1 generiert wurde (s. 4.4.1). Dabei ist davon auszugehen, dass auch dieses Serum aufgrund der Homologie der N-Termini von Munc13-1 und ubMunc13-2 vermutlich eine Kreuzreaktivität zu ubMunc13-2 aufweist (Betz, Thakur et al. 2001; Limbach, Laue et al. 2011).

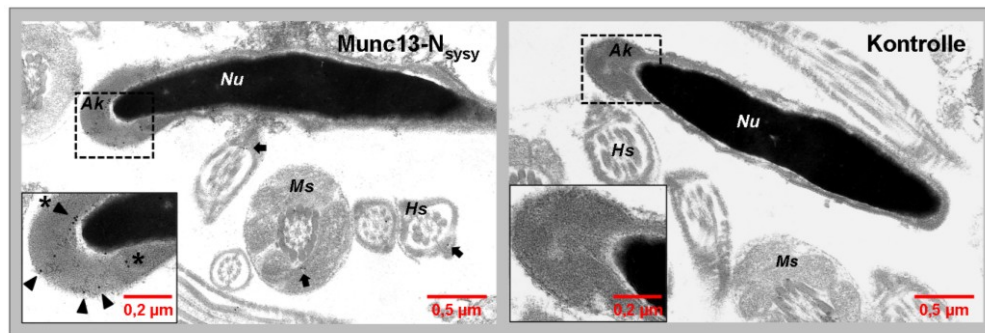


Abbildung 6.10: Ultrastrukturelle Lokalisation von Munc13 in Mausspermien.

Um die subzelluläre Lokalisation von Munc13 auf ultrastruktureller Ebene sichtbar zu machen, wurden indirekte Immunogold-Färbungen an Ultradünnschnitten von epididymalen Mausspermien durchgeführt, die anschließend mit Hilfe der Elektronenmikroskopie analysiert wurden. Der Nachweis gebundener Primärantikörper erfolgte durch an Goldpartikel gekoppelte Sekundärantikörper. Auf diese Weise präzipitierte Goldpartikel erscheinen aufgrund ihrer hohen Elektronendichte an den entsprechenden Stellen des Spermienquerschnittes als schwarze Partikel. Die Inkubation der Mausspermienquerschnitte mit dem anti-Munc13-N_{sysy} Antiserum (s. 4.4.1) führte zur Präzipitation von wenigen und vereinzelt liegenden Goldpartikeln im Mittelstück und Hauptstück des Flagellums (Pfeile) sowie Gruppen von wesentlich mehr Goldpartikeln, die im Bereich der Akrosomkappe konzentriert sind [Munc13-N_{sysy}]. Dabei ist im vergrößerten Ausschnitt in der unteren linken Ecke zu erkennen, dass die immunreaktiven Gold-Partikel sowohl in der unmittelbaren Nähe der Plasmamembran (Pfeilspitzen) als auch in der Umgebung des Nukleus (Pfeilspitzen mit Stern) und innerhalb der akrosomalen Matrix (Sterne) lokalisiert sind. Die Kontrolle ohne Primärantikörper-Inkubation [Kontrolle] wies keine präzipitierten Goldpartikel auf. Die durch gestrichelte Linien gekennzeichneten Bereiche der Akrosomkappe sind jeweils am unteren linken Bildrand im vergrößerten Ausschnitt dargestellt. Die Abbildungen stellen repräsentative Resultate aus mindestens zwei Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen dar. Ak: Akrosom, Hs: Hauptstück, Ms: Mittelstück, Nu: Nukleus.

In den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 6.10 sind neben quer angeschnittenen Bereichen des Mittelstücks (Ms) und des Hauptstücks (Hs) des Flagellums auch Längsschnitte von Spermienköpfen zu sehen, auf denen der Nukleus (Nu) als elektronendichte, schwarze Struktur auszumachen ist, dem das Akrosom (Ak) kappenartig aufsitzt. Die Analyse der Verteilung der präzipitierten kolloidalen Goldpartikel in den beiden Kompartimenten der Spermien ergab, dass wenige und vereinzelte Partikel in den Bereichen des Spermienchwanzes auszumachen waren (Abbildung 6.10, [Munc13-N_{sysy}], Pfeile). Im vergrößerten Ausschnitt der Mikrographie unten links ist hingegen deutlich zu erkennen, dass eine auffällig hohe Konzentration von Goldpartikeln in der akrosomalen Region lokalisiert war (Abbildung 6.10, [Munc13-N_{sysy}], Pfeilspitzen und Sterne). Dabei sind immunreaktive Goldpartikel sowohl an der Plasmamembran (Pfeilspitzen) als auch in der Nähe des Nukleus (Pfeilspitzen mit Stern) und im Bereich des Akrosoms (Sterne) auszumachen. Spermienquerschnitte, die

lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, zeigten keine Immunogold-Markierung (Abbildung 6.10, [Kontrolle]).

Da die in elektronenmikroskopischen Präparaten oft zur Darstellung von Lipiden und Membranen genutzte Osmiumoxid-Behandlung bei der Immunogold-Färbung die Antigenepitope maskieren kann und somit oft zu einem schwachen, nur unzureichenden Nachweis der Antigene führt (Zhong, Brown et al. 2013; persönliche Mitteilung Prof. Dr. Gerhard Aumüller, Philipps-Universität Marburg), wurde auf die Osmiumoxid-Behandlung der Präparate verzichtet. Deswegen sind in den hier dargestellten Immunogold-Färbungen (Abbildung 6.10) weder intrazelluläre Membranen, wie die Kernhülle und die akrosomale Membran, noch das Plasmalemma auszumachen. Ohne Darstellung der Membranen ist die exakte Zuordnung der Lokalisation der akrosomalen Goldpartikel zu entweder der zytosolischen oder der luminalen Seite der akrosomalen Membran schwer zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde Prof. Dr. Gerhard Aumüller, der über eine langjährige Fachkompetenz auf dem Gebiet der Immunogold-Färbungen von Spermienpräparaten verfügt, hinzugezogen. Seiner Einschätzung nach sind im Mittel etwa 60 % der präzipitierten Goldpartikel an der Plasmamembran lokalisiert, während die Markierung der Elektronen-dichten akrosomalen Matrix, die viele Antikörper in Immunogold-Färbungen hervorrufen können (Yamatoya, Yoshida et al. 2009), möglicherweise unspezifisch sein könnte. Um die Zuordnung der ultrastrukturellen Lokalisation des Munc13-Proteins in Spermien zu untermauern, wurden im Folgenden biochemische Studien zur Bestimmung der Assoziation von Munc13 an spezialisierte Bereiche der Plasmamembran, die *membrane rafts*, durchgeführt.

6.2.3 Assoziation von Munc13 an Detergens-unlösliche Membranmikrodomänen

Wie bereits erwähnt, werden die bisher nur zum Teil identifizierten *Zona pellucida*-Erkennungsproteine auf der Oberfläche des Spermiums sowie die für die Fusion der äußeren akrosomalen und der Plasmamembran verantwortlichen SNARE-Proteine in Spermien in *membrane rafts* konzentriert (Bou Khalil, Chakrabandhu et al. 2006; Tanphaichitr, Carmona et al. 2007; Tsai, De Vries et al. 2007; Boerke, Tsai et al. 2008; Gadella, Tsai et al. 2008). Um zu prüfen, ob Munc13 in Spermien als potentieller SNARE-Regulator in Betracht kommt, wurde zunächst in biochemischen Studien die Assoziation von ubMunc13-2 an Caveolin-1 enthaltende DRM-Fraktionen bestimmt (s. Abschnitt 6.1.3). Solche DRM-Fraktionen lassen sich aufgrund ihres hohen Cholesteringehalts und der daraus resultierenden Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien anreichern (Travis, Merdushev et al. 2001). Da in der akrosomalen Membran im Gegensatz zur Plasmamembran nur sehr wenig Cholesterin enthalten ist (Parks, Arion et al. 1987; Hinkovska-Galcheva und Srivastava 1993), erlaubt eine

etwaige Assoziation von Munc13 an die DRM-Fraktion außerdem Rückschlüsse auf eine Plasmamembran-ständige Lokalisation von Munc13 in Spermien.

Für die Analysen wurden gleiche Proteinmengen der Ausgangsmembranfraktion (P_2) sowie der in Triton X-100 löslichen Membranbestandteile (S_{TX}) und der nicht Detergens-löslichen Membrankomponenten (P_{TX}) im Immunoblot mit Hilfe des anti-Munc13- N_{abc} Antikörpers auf die Verteilung von Munc13 hin untersucht. Zur Zuordnung des Molekulargewichtes der Munc13-Isoformen wurden parallel aus der Großhirnrinde der Ratte isolierte Membranfraktionen analysiert. Um eine erfolgreiche Membran-Subfraktionierung zu verifizieren, wurde in einem weiteren Immunoblot mit denselben Fraktionen die Verteilung des *Caveolae*-Markerproteins Caveolin-1 untersucht (Ostrom und Liu 2007). Dieser Kontroll-Immunoblot belegte eine Anreicherung von Caveolin-1 in der Triton X-100-unlöslichen DRM-Fraktion (Abbildung 6.11, [Spermatozoa, P_{TX}], unterer Immunoblot).

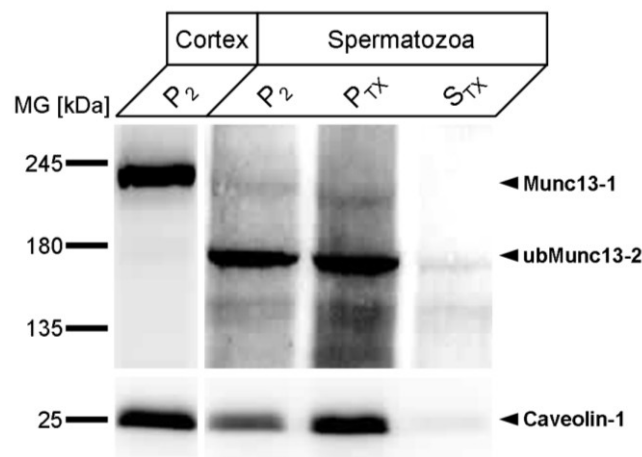


Abbildung 6.11: Lokalisation von Munc13 in Detergens-unlöslichen Membranmikrodomänen von epididymalen Spermien der Ratte.

Zur Analyse der Assoziation von Munc13 an Detergens-unlösliche Membranmikrodomänen in Spermien [Spermatozoa] wurden gleiche Proteinmengen der zur Extraktion verwendeten Membran-Ausgangsfraction [P_2] sowie der Detergens-löslichen [S_{TX}] und der DRM-Bestandteile [P_{TX}] im Immunoblot mit Hilfe des anti-Munc13- N_{abc} Antikörpers untersucht. Um die Isolierung der Membranmikrodomänen zu überprüfen, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen das *Caveolae*-Markerprotein Caveolin-1 eingesetzt, der die stärkste Caveolin-1-Immunreaktivität in der P_{TX} -Fraktion der Spermien zeigte (unterer Immunoblot). Zur Zuordnung der molekularen Masse der Munc13-Isoformen wurde zusätzlich zu den Spermienproben eine P_2 -Fraktion des gesamten Enzephalons hauptsächlich die Munc13-1-Isoform detektiert (Cortex, P_2). In den Spermienproben hingegen konnte nur ein sehr schwaches Munc13-1-Immunsignal detektiert werden; die prädominante Isoform ist ähnlich wie in den Membranen des Hodens und Nebenhodens die ubMunc13-2 *Splice*-Variante (Spermatozoa, oberer Immunoblot). Betrachtet man vergleichend die Immunsignale der Ausgangs-, der Detergens-löslichen und der -unlöslichen Membranfraktion, so fällt auf, dass die Intensität der ubMunc13-2-Immunreaktivität in der P_{TX} -Fraktion im Vergleich zur P_2 -Fraktion noch etwas stärker war, während die Detergens-löslichen Membranbestandteile kaum Munc13-Immunreaktivität aufwiesen. Die ubMunc13-2-Immunreaktivität zeigt also eine Co-Migration mit der Caveolin-1 enthaltenden P_{TX} -Fraktion.

Das Molekulargewicht in kDa ist auf der linken Seite der Immunoblots angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite geben das apparente Molekulargewicht der genannten Proteine an. Die oberen und unteren Teilbilder stellen Analysen derselben Fraktionen dar, die aufgrund der großen Unterschiede im Molekulargewicht von Munc13 und Caveolin-1 in getrennten SDS-PAGE-Gelen und Immunoblots untersucht wurden. Die Immunoblots des Cortex und der Spermien befanden sich auf demselben Nitrozellulosebogen, wurden bei der Detektion jedoch unterschiedlich langen Expositionszeiten ausgesetzt, sodass lediglich die Spermienproben bei gleicher Proteinmenge auf eine Anreicherung hin untersucht werden können. Die gezeigten Immunoblots sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen.

Die Untersuchung der Membransubfraktionen der Spermien hinsichtlich der immunmarkierten Munc13-Isoformen untermauerte die vorherige Beobachtung (Abbildung 6.7) einer starken Expression der ubMunc13-2 *Splice*-Variante in Rattenspermien (Abbildung 6.11, [Spermatozoa]). Des Weiteren zeigte sich beim direkten Vergleich der Verteilung des ubMunc13-2-Immunsignals in den verschiedenen Spermienfraktionen, dass die Detergens-löslichen Membranbestandteile (Abbildung 6.11, [Spermatozoa, S_{TX}]) kaum ubMunc13-2-Immunreaktivität aufwiesen. Die ubMunc13-2-Immunreaktivität war auf die Membranausgangs- und die DRM-Fraktion beschränkt (Abbildung 6.11, [P_2] und [P_{TX}]). Dabei war das ubMunc13-2-Immunsignal, genauso wie die Caveolin-1-Immunreaktivität, in der DRM-Fraktion (P_{TX}) im Vergleich zur P_2 -Fraktion sogar etwas stärker.

Die beschriebene Co-Migration von ubMunc13-2 mit der Caveolin-1 enthaltenden, Detergens-unlöslichen Membranfraktion aus epididymalen Rattenspermien legt eine Assoziation des CAZ-Proteins an spezialisierte Membranmikrodomänen nahe. Solche Cholesterin-reichen Membrandomänen können aufgrund des geringen Cholesteringehaltes in der akrosomalen Membran kaum vorkommen (Parks, Arion et al. 1987; Hinkovska-Galcheva und Srivastava 1993). Dieser Befund bekräftigt daher die in den elektronenmikroskopischen Studien ermittelte ultrastrukturelle Lokalisation des ubMunc13-2-Proteins an der Plasmamembran des Spermienkopfes (Abbildung 6.10).

6.2.4 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der verschiedenen strukturellen Munc13-Domänen für die akrosomale Exozytose von Mausspermien

Eine Besonderheit der Munc13-Proteine besteht darin, dass der C-Terminus, der die mit dem SNARE-Protein Syntaxin interagierende MUN-Domäne enthält, in allen fünf Subtypen und über Speziesgrenzen hinweg konserviert ist (Betz, Thakur et al. 2001), während sich die N-Termini der meisten Isoformen stark unterscheiden (Abbildung 6.6). Eine Ausnahme bilden dabei Munc13-1 und ubMunc13-2, deren homologe N-Termini (Betz, Thakur et al. 2001) die Interaktion mit RIM-Proteinen vermitteln (Deng, Kaeser et al. 2011). Durch diese RIM-Interaktion wird die Vesikel-*priming*-Funktion der Munc13-1- und ubMunc13-2-Proteine aktiviert, sodass die beiden zur Dynamik der Vesikelexozytose in der aktiven Zone von Neuronen beitragen können (Deng, Kaeser et al. 2011). Da speziell die ubMunc13-2 *Splice*-Variante auch in Spermien von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6.7), wo sie in der akrosomalen Sichel (Abbildung 6.9 und 6.10) in Caveolin-1 enthaltenden DRMs angereichert ist (Abbildung 6.11), in denen auch die für die Akrosomreaktion wichtigen SNARE-Proteine konzentriert sind, wurde analysiert, ob Munc13 von funktioneller Bedeutung für die Akrosomreaktion sein könnte.

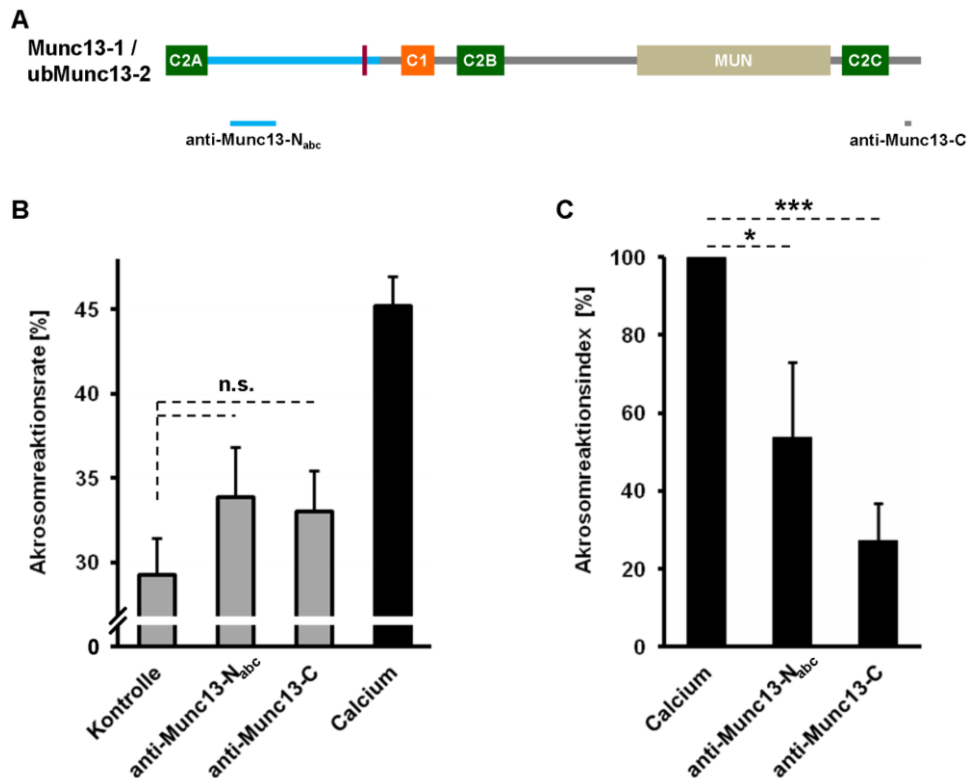


Abbildung 6.12: Funktion der Munc13-Domänen bei der spontanen und Calcium-induzierten Akrosomreaktion von Mausspermien.

[A] Die schematische Darstellung der Domänenstruktur von Munc13-1 und ubMunc13-2 demonstriert die Position der immunogenen Peptide, die von den in [B] und [C] verwendeten Antikörpern gebunden werden (schwarze Balken). Der anti-Munc13-N_{abc} Antikörper detektiert den homologen N-Terminus von Munc13-1 und ubMunc13-2, während der anti-Munc13-C Antikörper den C-Terminus von Munc13-1 und Munc13-2 erkennt. Strukturelle Domänen sind als Quader, das Polypeptidrückgrat als Balken dargestellt. C2: C2-Domäne, C1: C1-Domäne, MUN: Munc-Homologie-Domäne, roter Streifen: Calmodulin-Bindestelle.

[B] Zur Analyse der Bedeutung der N- bzw. C-terminalen Domänen von Munc13 für spontane, durch die Kapazitation ausgelöste akrosomale Exozytoseereignisse, wurden mit SLO permeabilisierte, *in vitro* kapazitierte Balb/C Mausspermien mit den in [A] spezifizierten anti-Munc13 Antikörpern inkubiert. Dabei wurden Negativkontrollen in die Versuchsreihen integriert, die die spontane Exozytoserate permeabilisierter Spermien ohne Antikörperinkubation [Kontrolle] erfassen. Die erfolgreiche Permeabilisierung der Spermienmembran wurde durch die Zugabe von CaCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM überprüft [Calcium]. Vergleicht man die spontanen Exozytoseraten der Spermien, die mit einem der anti-Munc13 Antikörper vorinkubiert wurden, mit der Negativkontrolle, so fällt auf, dass die spontane Akrosomreaktionsrate beider Antikörper-Proben leicht, aber nicht signifikant erhöht war. Die dargestellten Mittelwerte \pm SEM stellen die prozentualen Akrosomreaktionsraten aus 11 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spermienpräparationen dar.

[C] Um die Bedeutung der N- bzw. C-terminalen Domänen von Munc13 für die Calcium-induzierte Akrosomreaktion anhand von permeabilisierten, *in vitro* kapazitierten Spermien zu bestimmen, wurden die in [A] spezifizierten Antikörper appliziert und anschließend die akrosomale Exozytose durch die Zugabe von CaCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM ausgelöst. Die Quantifizierung der Akrosomreaktionsraten der Spermienproben ergab, dass der Akrosomreaktionsindex der Spermien, die mit dem anti-Munc13-N_{abc} Antikörper vorinkubiert wurden, signifikant und um ca. 50 % im Vergleich zu den Spermienproben ohne Antikörperinkubation [Calcium] reduziert war. Die Blockierung des C-Terminus von Munc13 hatte sogar eine noch stärkere, hochsignifikante Inhibition der Akrosomreaktion von ca. 70 % zur Folge. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsindices (Formel 6.1) \pm SEM, in die Daten von 11 unabhängigen Spermienpräparationen eingeflossen sind.

Die statistische Analyse erfolgte mittels eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und ist mit *: $p < 0,05$ und ***: $p < 0,001$ gekennzeichnet. n.s.: nicht signifikant.

Dafür wurden mit SLO permeabilisierte Spermien mit Epitop-spezifischen anti-Munc13 Antikörpern inkubiert, die eine selektive Inhibition entweder des Syntaxin-bindenden C-Terminus oder des RIM-bindenden N-Terminus sowohl von Munc13-1 als auch von ubMunc13-2 erlauben (Abbildung 6.12A). Wie schon für die Analyse der Bedeutung von

Bassoon und Piccolo/Aczonin für die Akrosomreaktion beschrieben (s. Abschnitt 6.1.2, Tabelle 6.1), wurde in diesen Studien jeweils zum einen die spontane akrosomale Exozytoserate der mit den anti-Munc13 Antikörpern vorinkubierten Spermien quantifiziert. Zum anderen wurde die Auswirkung der Inhibition von Munc13 auf die Calcium-abhängige Aktivierung der SNARE-Fusionsmaschinerie durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration in den mit anti-Munc13 Antikörpern behandelten Spermien bestimmt.

Als Negativkontrolle wurde der prozentuale Anteil an Spermien ermittelt, die ohne Antikörperinkubation und ohne Calcium-Stimulation eine spontane Akrosomreaktion durchliefen (Klemm und Engel 1991). Die basale, aufgrund der Kapazitation und Permeabilisierung der Spermien resultierende spontane Akrosomreaktionsrate (Michaut, De Blas et al. 2001) der Negativkontrolle betrug in der hier gezeigten Versuchsreihe im Mittel $29,25 \pm 2,17 \%$ (Abbildung 6.12B, [Kontrolle]). Zusätzlich wurde in jedem der Ansätze eine Positivkontrolle mitgeführt, deren Akrosomreaktionsrate nach Applikation von CaCl_2 in einer Endkonzentration von 10 mM im Mittel $45,20 \pm 1,73 \%$ betrug (Abbildung 6.12B, [Calcium]). Vergleicht man nun die spontanen Exozytoseraten der Spermien, die mit den anti-Munc13 Antikörpern vorinkubiert wurden, mit der entsprechenden Negativkontrolle, ist eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Erhöhung der spontanen Akrosomreaktionsrate zu registrieren (Abbildung 6.12B, [anti-Munc13-N_{abc}]: $33,89 \pm 2,95 \%$, [anti-Munc13-C]: $33,04 \pm 2,40 \%$). Diese wurde ebenfalls bei der Inkubation mit unspezifischen Antikörpern beobachtet (Abbildung 6.2B).

Nachdem keine signifikanten Auswirkungen der anti-Munc13 Antikörper auf die spontane Akrosomreaktion der Spermien festgestellt werden konnten, wurde als nächstes die Bedeutung der N- und C-terminalen Domänen von Munc13 für die Calcium-vermittelte Aktivierung der akrosomalen Exozytose analysiert. Dafür wurden die Akrosomreaktionsindices (Formel 6.1, S. 88) der mit dem anti-Munc13-N_{abc} oder dem anti-Munc13-C Antikörper vorinkubierten Spermien nach Zugabe von CaCl_2 in einer Endkonzentration von 10 mM bestimmt. Die Analyse der Daten zeigt, dass die Vorinkubation der Spermien mit dem anti-Munc13-N_{abc} Antikörper zu einem im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 6.12C, [Calcium]: 100 %) um ca. 50 % signifikant reduzierten Akrosomreaktionsindex führte ([anti-Munc13-N_{abc}]: $53,87 \pm 19,2 \%$). Die mit dem anti-Munc13-C Antikörper vorinkubierten Spermien zeigten sogar eine noch stärkere, verglichen mit der Calcium-Kontrolle hochsignifikante Reduzierung des Akrosomreaktionsindex (Abbildung 6.12C, [anti-Munc13-C]: $27,18 \pm 9,6 \%$).

Zusammenfassend kann anhand der hier gezeigten Versuchsreihen eine Funktion von Munc13 während des spontanen akrosomalen Exozytoseprozesses nicht konstatiert werden. Jedoch lässt sich festhalten, dass die Inhibition sowohl der *priming*-vermittelnden C-terminalen Domänen von Munc13-1 und Munc13-2 als auch der

Interaktionsdomänen des N-Terminus von Munc13-1 und/oder ubMunc13-2 die Calcium-vermittelte Akrosomreaktion reduzieren. Dieser Befund deutet auf eine funktionelle Beteiligung dieser Munc13-1/ubMunc13-2 Domänen an der Calcium-vermittelten akrosomalen Exozytose hin.

6.3 Bedeutung des *Rab3-interacting molecule* (RIM) für die Reproduktion von Nagern

Der N-Terminus von Munc13-1 und ubMunc13-2, für den eine funktionelle Rolle bei der Calcium-vermittelten Akrosomreaktion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6.12C), ist an der neuronalen Synapse ein wichtiger „molekularer Knotenpunkt“ für das aus CAZ-Proteinen aufgebaute dynamische Netzwerk (Wang, Hu et al. 2009). Mittels der N-terminalen C2A-Domäne, die nur in den Munc13-1- und ubMunc13-2-Isoformen vorhanden ist (Abbildung 6.6), interagieren beide Munc13-Isoformen mit RIM-Proteinen der präsynaptischen aktiven Zone (Deng, Kaeser et al. 2011). Diese Interaktion, bei der ein RIM-Munc13-Heterodimer entsteht (Deng, Kaeser et al. 2011), ist das Schlüsselereignis für die Aktivierung der Vesikel-*priming*-Funktion der C-terminalen Domänen von Munc13-1 und ubMunc13-2. Durch das entstandene RIM-Munc13-Heterodimer wird die Autoinhibition der Munc13-Proteine aufgehoben (Deng, Kaeser et al. 2011). Aufgrund dieser zentralen funktionellen Rolle der RIM-Proteine ist es wichtig zu analysieren, ob die Munc13-aktivierenden RIM-Proteine ebenfalls im männlichen Reproduktionssystem von Nagern exprimiert werden und somit die Möglichkeit besteht, dass sie auch bei der Akrosomreaktion eine ähnlich bedeutende Funktion übernehmen (Sudhof 2012).

6.3.1 Identifikation von RIM-Isoformen im männlichen Reproduktionssystem von Maus und Ratte

Es gibt insgesamt sieben verschiedene RIM-Isoformen (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008), die nicht alle die für die Interaktion mit Munc13 notwendige Domäne enthalten (Dulubova, Lou et al. 2005). Von den beiden Hauptformen RIM1 und RIM2 existieren jeweils eine lange α -Isoform und eine N-terminal verkürzte β -Variante (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008; Abbildung 6.13). Dabei besitzen nur die beiden langen α RIM-Proteine RIM1 α und RIM2 α und die nur wenig kürzere RIM1 β -Isoform das für die Interaktion mit Munc13 verantwortliche N-terminale Zinkfinger-Motiv, wohingegen dem RIM2 β -Protein die Munc13-Interaktionsdomäne fehlt (Wang und Sudhof 2003; Kaeser, Kwon et al. 2008). In einem ersten Schritt wurde daher überprüft, welche der Isoformen im männlichen Reproduktionsgewebe und in isolierten epididymalen Spermien von Ratten und Mäusen vorkommen. Die γ RIM-Isoformen RIM2 γ , RIM3 γ und RIM4 γ sind die kleinsten RIM-Proteine und bestehen lediglich aus der C-terminalen C2B-Domäne und flankierenden Aminosäuresequenzen (Wang und Sudhof 2003; Abbildung 6.13). Da ihnen ein Großteil der Interaktionsdomänen der α - und β RIM-Proteine fehlt, – vor allem diejenigen, mit denen

sie mit den anderen CAZ-Proteinen interagieren (Schoch und Gundelfinger 2006) – wurden sie in den folgenden Analysen zurückgestellt. Zusätzlich zu der erheblichen Isoform-Diversität der RIM-Proteine erhöht außerdem umfangreiches alternatives *Splicing* (Wang und Sudhof 2003) die Vielfalt der α - und β RIM-Proteine, wodurch mehr als 100 verschiedene *Splice*-Varianten entstehen können, die sich in ihrem Molekulargewicht um mehr als 30 kDa unterscheiden können (Wang, Sugita et al. 2000; Wang und Sudhof 2003).

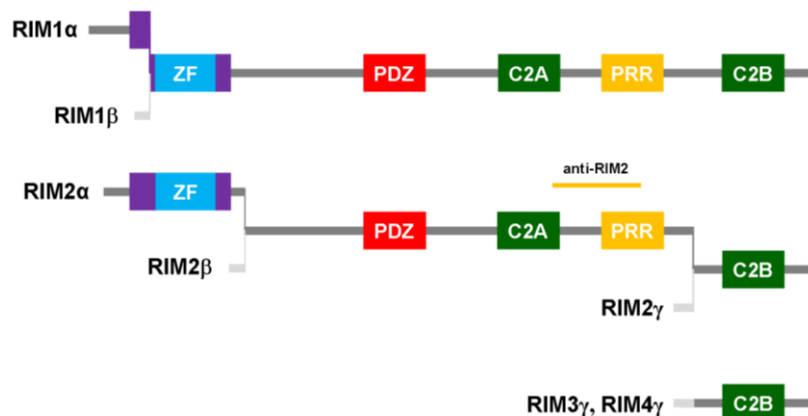


Abbildung 6.13: Domänenstruktur der RIM-Proteine.

Nur die langen α RIM-Isoformen RIM1 α und RIM2 α bestehen aus der gesamten Abfolge der verschiedenen identifizierten strukturellen Bindungsdomänen: N-terminal besitzen α RIM-Proteine die namensgebende, Rab3-bindende α -Helix (violett), die ein Zinkfinger-Motiv (ZF, blau) umschließt, das die RIM-Proteine RIM1 α , RIM1 β und RIM2 α zur Interaktion mit Munc13 befähigt. In C-terminaler Richtung folgen eine zentrale PDZ-Domäne (PDZ, rot) und eine Prolin-reiche Region (PRR, gelb), die von zwei C2-Domänen flankiert wird (C2A und C2B, grün). RIM1 β ist N-terminal um die Rab3-Bindesequenz, RIM2 β zusätzlich zur α -Helix auch um die ZF-Domäne verkürzt. Die kleinen γ -Isoformen bestehen dagegen lediglich aus der C2B-Domäne. Alle verkürzten β - und γ -Isoformen besitzen jeweils einen Isoform-spezifischen N-Terminus (schmaler hellgrauer Balken). Strukturelle Domänen sind als farbige Quader, das Polypeptidrückgrat als schmaler dunkelgrauer Balken im Hintergrund dargestellt. Der gelbe Balken gibt die Position der antigenen Aminosäuren des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers an.

In der bisher publizierten Literatur bezüglich der Expressionsprofile der RIM-Proteine konnten Transkripte des *Rims1*-Gens in RNA-Analysen verschiedener Rattengewebe ausschließlich im Gehirn identifiziert werden (Wang, Okamoto et al. 1997; Ozaki, Shibasaki et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurden Transkripte des *Rims2*-Gens zusätzlich zum Gehirn auch im Testis der Ratte nachgewiesen (Ozaki, Shibasaki et al. 2000; Wang, Sugita et al. 2000). Spätere RNA-Blot- und RT-PCR-Analysen von Mausgewebe konnten das Vorhandensein von RIM2-mRNA im Hoden bestätigen (Uriu, Kiyonaka et al. 2010). RIM1-mRNA konnte zwar in geringen Mengen auch im Testis, aber zu einem deutlich größeren Anteil im Gehirn detektiert werden (Uriu, Kiyonaka et al. 2010). Da aufgrund der höheren relativen mRNA-Spiegel eine testikuläre Expression der RIM2-Proteine wahrscheinlicher erscheint als die der RIM1-Proteine, wurde zunächst die Proteinexpression der RIM2-Proteine im männlichen Keimdrüsengewebe der Maus untersucht.

Dazu wurde die Immunoblot-Technik und verschiedene, Isoform-spezifische anti-RIM Antikörper eingesetzt. Durch die Vielfalt der Isoformen und der *Splice*-Varianten ist

bereits bekannt, dass ein teilweise den Isoformen schwer zuzuordnendes Leiter-artiges immunreaktives Muster zu registrieren ist (Wang, Sugita et al. 2000; Schoch, Castillo et al. 2002). In den nachfolgenden Untersuchungen wurden Membranfraktionen aus verschiedenen Reproduktionsorganen eingesetzt, die wiederum Spermien unterschiedlicher Entwicklungsstadien enthalten. Neben Hoden- und Nebenhodengewebe wurden für die fraktionelle Zentrifugation reife epididymale Spermien verwendet (für eine nähere Erläuterung s. Abschnitt 6.2.1). Die Expressionsanalyse, die sich aus den o.g. Gründen initial auf RIM2-Proteine konzentrierte, wurde anschließend im Immunoblot mit Hilfe eines Antikörpers analysiert, der RIM2 spezifisch erkennt. Das Epitop des anti-RIM2 Antikörpers liegt im identischen C-terminalen Bereich von RIM2 α und RIM2 β (gelber Balken in Abbildung 6.13), sodass der Antikörper beide Isoformen detektiert. Eine Identifikation der verschiedenen RIM2-Isoformen ist allerdings notwendig, da nicht alle Isoformen jede Interaktionsdomäne besitzen (Abbildung 6.13). Folglich kann nicht jede Isoform die für die Funktion der RIM-Proteine entscheidenden Interaktionen eingehen können (Kaesler, Deng et al. 2012). Gegenwärtig stehen keine Antikörper zur Verfügung, die spezifisch zwischen der α - oder β -Isoform des RIM2-Proteins unterscheiden. Allerdings besitzt das *Rims2*-Gen verschiedene interne Promotoren, die zur Expression entweder der RIM2 α -, der RIM2 β - oder der RIM2 γ -Isoform führen (Wang und Sudhof 2003). Für die Zuordnung der im Immunoblot detektierten immunreaktiven Banden kann daher ein RIM2 α -defizientes Mausmodell verwendet werden (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Für die Generierung des RIM2 α -defizienten Mausmodells wurde die kodierende Sequenz des Exon 5 deletiert, das *upstream* des β -spezifischen Promotors liegt. Durch dieses Vorgehen sind die generierten Mäuse ausschließlich für das RIM2 α -Protein defizient (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Das Mausmodell eignet sich daher ausgezeichnet als Negativkontrolle für die Immunoblot-Detektion der RIM2 α -Isoform. Für die Immunoblotanalysen wurden Membranfraktionen aus Gehirngewebe der Maus mit Membranfraktionen verglichen, die aus dem Enzephalon von RIM2 α -defizienten Mäusen gewonnen wurden (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Der dabei verwendete spezifische anti-RIM2 Antikörper zeigte im Gehirngewebe aus Wildtyp-Mäusen das typische Leiter-artige Bandenmuster (Abbildung 6.14A, [+/+]), das die für die RIM-Proteine charakteristische Vielfalt der unterschiedlichen Molekulargewichte der α - und β -Isoformen und ihrer alternativen *Splice*-Varianten widerspiegelt (Wang, Sugita et al. 2000; Khanna, Li et al. 2006; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Außerdem war zu erkennen, dass im Wildtypgewebe zwei RIM2-immunreaktive Banden mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 180 kDa und ca. 170 kDa (Abbildung 6.14A, [+/+]) detektiert wurden, die in etwa dem apparenten Molekulargewicht von RIM2 α entsprechen (Khanna, Li et al. 2006; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Diese Banden waren im RIM2 α -defizienten Gehirngewebe nicht vorhanden (Abbildung 6.14A, [-/-]). Daher sind die detektierten Immunsignale auf das RIM2 α -Protein zurückzuführen,

wohingegen die verbleibenden RIM2-immunreaktiven Banden im RIM2 α -defizienten Enzephalongewebe die verschiedenen *Splice*-Varianten der RIM2 β -Isoform repräsentieren (Abbildung 6.14A, [-/-]). Vergleichbare Erkenntnisse wurden auch mit Hilfe von Immunoblot-Analysen mit RIM2 α -defizientem Hodengewebe gewonnen (Abbildung 6.21).

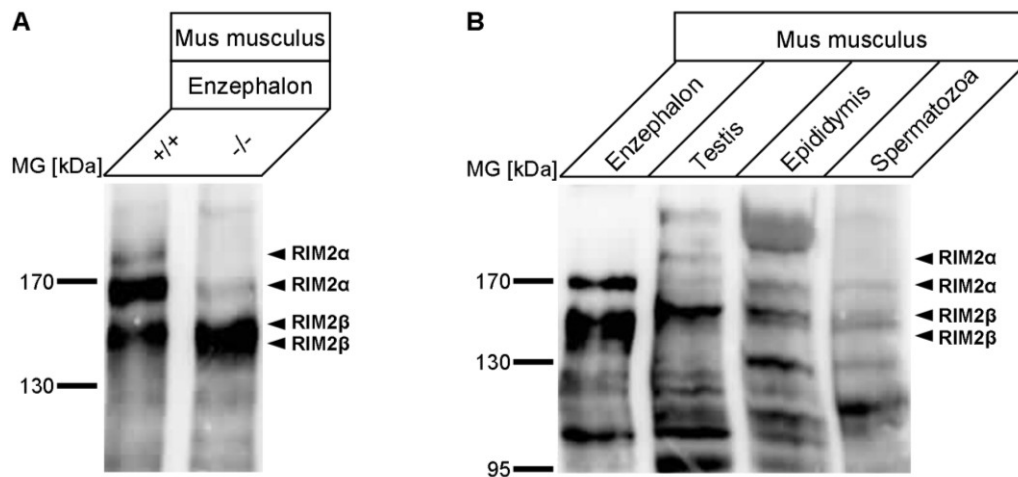


Abbildung 6.14: RIM2-Expression im männlichen Reproduktionssystem von Mäusen.

[A] Gleiche Proteinmengen von Membranfraktionen aus Enzephalongewebe von RIM2 α -defizienten Mäusen [-/-] und Wildtypen [+/-] wurden mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers im Immunoblot analysiert. In den Gehirnproben wurden zwei RIM2 α -immunreaktive Banden aufgrund des fehlenden Immunsignals im *knockout*-Gewebe im Vergleich zu den Wildtyp-Proben identifiziert. Weitere immunreaktive Banden persistierten im RIM2 α -defizienten Enzephalongewebe und können demnach den *Splice*-Varianten der RIM2 β -Isoform zugeordnet werden.

[B] Um festzustellen, welche RIM2-Isoformen im männlichen Reproduktionssystem der Maus exprimiert werden, wurden Membranfraktionen aus Hoden [Testis], Nebenhoden [Epididymis] und epididymalen Spermien [Spermatozoa] mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers im Immunoblot analysiert. Zur direkten Zuordnung der detektierten immunreaktiven Banden wurden parallel dazu Gehirn-Membranfraktionen [Enzephalon] verwendet, die ein Leiter-artiges Bandenmuster erkennen ließen, dessen Banden den α - und β -Isoformen der RIM2-Proteine anhand von Abbildung [A] zugeordnet werden konnten. Im Vergleich dazu ergab die Analyse der Reproduktionsorgane, dass die im Enzephalon detektierten RIM2 α und RIM2 β *Splice*-Varianten im Hoden, Nebenhoden sowie in den Spermien nachzuweisen waren.

Das Molekulargewicht in kDa ist für den jeweiligen Immunoblot links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite markieren die molekulare Masse der RIM2-Isoformen. Die ausgewählten Immunoblots zeigen repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Gewebe- bzw. Spermienpräparationen.

Vergleicht man die Membranfraktion des Hodengewebes mit den Ergebnissen der komparativen Immunoblots der Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Enzephalonproben, wird deutlich, dass sowohl das RIM2 α -Protein als auch die kleineren RIM2 β *Splice*-Varianten im Wildtyp-Maushoden exprimiert werden (Abbildung 6.14B, [Testis]). Betrachtet man außerdem die immunreaktiven Banden des Nebenhodens, ergibt sich ein ganz ähnlicher Befund. Sowohl eine RIM2 α -Immunmarkierung mit einer molekularen Masse von ca. 170 kDa als auch RIM2 β -Isoformen mit geringerem Molekulargewicht wurden im Nebenhodengewebe nachgewiesen (Abbildung 6.14B, [Epididymis]). Im oberen Molekulargewichtsbereich wurden zudem zusätzliche Immunsignale detektiert, bei denen es sich möglicherweise um heteromere Komplexe von RIM-Proteinen mit anderen Komponenten der Exozytosemaschinerie handeln könnte (Linderoth, Model et al. 1996; Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). In den epididymalen Spermien der Maus wurden ebenfalls RIM2 α - und RIM2 β -Immunsignale registriert

(Abbildung 6.14B, [Spermatozoa]), die dasselbe Molekulargewicht wie die RIM2-Isoformen des Enzephalons aufwiesen. Demnach sind beide RIM2-Isoformen während der Keimzellbildung und in reifen Spermatozoen von Mäusen exprimiert.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete murine Expression der beiden RIM2-Isoformen auch in den Keimdrüsen anderer Säugerspezies nachzuweisen ist, wurden analoge Immunoblot-Analysen mit Rattenproben durchgeführt. Um die Trennschärfe der Proben in der SDS-PAGE zu verbessern, wurden die Membranfraktionen zusätzlich einer Extraktion mit Harnstoff unterzogen. Dadurch werden Membran-assoziierte Proteine von den Lipiden und den lipophilen integralen Membranproteinen separiert (Gonen, Donaldson et al. 2000). Im Immunoblot wurden nach dieser Extraktion (Abbildung 6.15A) distinktere immunreaktive Banden detektiert als in den entsprechenden Mausproben ohne Harnstoffbehandlung (Abbildung 6.14B) und potentielle hochmolekulare Heteromere waren kaum noch detektierbar. Da in der Rattenenzephalonprobe ein sehr ähnliches Bandenmuster wie im Mausgehirn (Abbildung 6.14B) zu erkennen war, wurde die Zuordnung der RIM2-Isoformen in Analogie zum Mausgewebe vorgenommen.

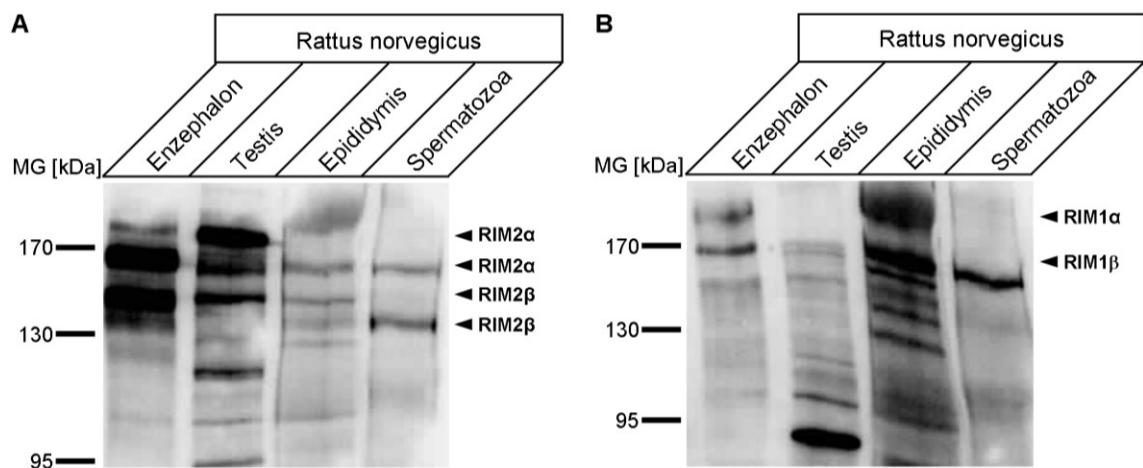


Abbildung 6.15: RIM-Expression im männlichen Reproduktionssystem der Ratte.

[A] Um die Membran-assoziierten RIM-Proteine von den Membranlipiden und integralen Membranproteinen zu trennen und damit das Laufverhalten der RIM-Proteine in der SDS-PAGE zu verbessern, wurden Membranfraktionen aus Gehirn, Hoden, Nebenhoden und epididymalen Spermien der Ratte einer Extraktion mit Harnstoff unterzogen. Die Detektion von RIM2 in den Harnstoff-extrahierten Membranfraktionen mittels des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers zeigte erneut eine Leiter-artige Immunmarkierung [Enzephalon], die den α - und β -Isoformen der RIM2-Proteine in Anlehnung an das Mausgewebe (Abbildung 6.14) zugeordnet werden konnte: RIM2 α und RIM2 β waren demnach in den Reproduktionsgeweben und epididymalen Spermien nachzuweisen. Dabei reduzierte sich die Anzahl der detektierten *Splice*-Varianten in den Harnstoff-extrahierten Proben mit zunehmendem Reifegrad der Keimzellen.

[B] Zur Überprüfung, ob das RIM1-Protein möglicherweise auch in männlichen Keimdrüsen von Nagern exprimiert ist, wurden die Harnstoff-extrahierten Membranfraktionen aus Rattengehirn, -hoden, -nebenhoden und epididymalen Rattenspermien im Immunoblot zusätzlich mit Hilfe eines spezifischen anti-RIM1 Antikörpers analysiert. Dabei wurden im Enzephalon-Kontrollgewebe zwei immunreaktive Banden detektiert, deren Molekulargewicht in etwa dem von RIM1 α bzw. RIM1 β entspricht. Im Nebenhodengewebe wurde neben zwei immunreaktiven Banden desselben Molekulargewichts eine große Anzahl weiterer Immunsignale registriert, die entweder *Splice*-Varianten oder proteolytische Spaltprodukte der beiden RIM1-Isoformen darstellen. Im Gegensatz dazu wurden in der Hoden- und in der Spermienfraktion lediglich RIM1 β -immunreaktive Banden detektiert.

Das Molekulargewicht in kDa ist für den jeweiligen Immunoblot links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite markieren die molekulare Masse der RIM-Isoformen. Die ausgewählten Immunoblots zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Gewebe- bzw. Spermienpräparationen.

Die Betrachtung der Hoden- und Nebenhodenproben zeigte, dass RIM2 α und verschiedene *Splice*-Varianten von RIM2 β in männlichen Keimdrüsengeweben der Ratte nachzuweisen sind (Abbildung 6.15A, [Testis], [Epidydimis]). Hingegen wies die Harnstoff-extrahierte Membranfraktion reifer, epididymaler Rattenspermien nur jeweils eine RIM2 α und eine RIM2 β *Splice*-Variante auf (Abbildung 6.15A, [Spermatozoa]), was auf eine geringere *Splicing*-Vielfalt in reifen Rattenspermien zurückzuführen sein könnte. Möglich ist aber auch, dass die verschiedenen *Splice*-Varianten eine unterschiedliche Affinität zu den Lipiden selbst und/oder lipophilen integralen Membranproteinen aufweisen. Durch diese Unterschiede ihrer biochemischen Eigenschaften im Komplex sind sie bei der Harnstoff-Extraktion möglicherweise in unterschiedlichen Fraktionen zu finden. Da in nicht Harnstoff-behandelten Membranfraktionen aus Rattenspermien (Abbildung 6.17A, [Spermatozoa, P₂]) alle im Nebenhoden (Abbildung 6.15A, [Epidydimis]) detektierten RIM2 β *Splice*-Varianten nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass die verschiedenen RIM2 β *Splice*-Varianten unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzen. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die Expression von RIM2 α und RIM2 β im männlichen Reproduktionssystem über Speziesgrenzen hinweg konserviert ist.

Wie oben erwähnt, legen RNA-Blot und RT-PCR Studien nahe, dass das RIM1-Protein nicht oder nur in geringer Menge im männlichen Reproduktionssystem exprimiert wird (Wang, Okamoto et al. 1997; Ozaki, Shibasaki et al. 2000; Uriu, Kiyonaka et al. 2010). Da diese Analysen sich auf den Nachweis von RIM1-mRNA und nicht auf die Detektion von RIM1 auf Proteinebene stützen, wurden die Harnstoff-extrahierten Membranfraktionen des Rattenreproduktionssystems zusätzlich mit einem spezifischen anti-RIM1 Antikörper im Immunoblot analysiert. Das *Rims1*-Gen besitzt wie das *Rims2*-Gen unabhängige interne Promotoren, um die RIM1 α - und RIM1 β -Isoformen zu generieren (Kaeser, Kwon et al. 2008; Kaeser, Deng et al. 2012). Da beide Isoformen von dem spezifischen anti-RIM1 Antikörper detektiert werden, erlaubt auch hier nur die Orientierung am RIM1 α -defizienten Gewebe eine Zuordnung der RIM1-immunreaktiven Banden zu den α - und β -Isoformen (Kaeser, Kwon et al. 2008). Die zwei im Immunoblot des Rattengehirns detektierten RIM1-immunreaktiven Banden mit einer molekularen Masse von ca. 170 kDa und 190 kDa (Abbildung 6.15B, [Enzephalon]) entsprechen dabei in etwa dem apparenten Molekulargewicht von RIM1 α und RIM1 β (Kaeser, Kwon et al. 2008). In der Analyse der Keimdrüsen- bzw. Keimzellfraktionen zeigte sich, dass entgegen den Erwartungen (s. o.) eine RIM1-Immunreaktivität im Reproduktionssystem der Ratte registriert werden konnte (Abbildung 6.15B). Allerdings wurden in der Hoden- und in der Spermienprobe nur Proteine mit dem Molekulargewicht von RIM1 β detektiert (Abbildung 6.15B, [Testis], [Spermatozoa]), wohingegen in der Nebenhodenfraktion eine Vielzahl von

immunreaktiven Banden erkennbar waren (Epididymis). Im Gegensatz zu RIM1 α konnte RIM1 β demnach in allen Stadien der Keimzellentwicklung nachgewiesen werden.

6.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RIM2 in Mausspermien

In früheren Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass das RIM2-Protein, genauso wie die CAZ-Proteine Bassoon, Piccolo/Aczonin und Munc13 (Abbildung 6.1 und 6.9), in der akrosomalen Region von Mausspermien lokalisiert ist (Diplomarbeit Nele Zitranski, 2008). Allerdings wurde in diesen ersten Analysen ein Antikörper eingesetzt, für den eine schwache Kreuzreaktivität mit RIM1 beschrieben ist (anti-RIM2 PDZ, Abbildung 6.20A). Da nun jedoch erstmals auch eine Expression von RIM1 β in Nagerspermien nachgewiesen wurde (Abbildung 6.16B), könnte das zu dem damaligen Zeitpunkt in der akrosomalen Sichel von Mausspermien detektierte Immunsignal auf die Anwesenheit des RIM1 β -Proteins zurückzuführen sein. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit indirekte immunzytochemische Färbungen mit dem Antikörper durchgeführt, der spezifisch das RIM2-Protein erkennt (Abbildung 6.13). Diese experimentellen Ansätze führten auch nach verschiedenen Variationen der Fixierungsmethode (Methanol, Aceton, Paraformaldehyd) und des Detektionsverfahrens für gebundenen Primärantikörper (Fluoreszenznachweis, chromogene DAB-Färbung) zu keiner eindeutigen und reproduzierbaren Immunmarkierung der Spermien durch den spezifischen anti-RIM2 Antikörper (nicht gezeigt).

Für manche Antikörper, die ebenfalls in immunzytochemischen Färbungen keine eindeutigen Markierungen zeigten, konnte in Immunogold-Färbungen an Ultradünnschnitten durchaus eine spezifische Immunmarkierung festgestellt werden (Arndt, Castonguay et al. 2014). Eine Erklärung hierfür stellt möglicherweise die andere Fixierungsmethode der Präparate dar. Für die weitere Analyse der RIM2-Expression wurde daher eine ultrastrukturelle elektronenmikroskopische Analyse von Mausspermien-Ultradünnschnitten durchgeführt, die zuvor einer Immunogold-Färbung mit dem spezifischen anti-RIM2 Antikörper unterzogen wurden (Zusammenarbeit mit PD Dr. Beate Wilhelm, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg). Der Fokus lag dabei auf der Bestimmung der subzellulären Lokalisation des RIM2-Proteins in Mausspermien, dessen α - und β -Isoformen in allen Stadien der Spermienentwicklung der untersuchten Nagerspezies nachgewiesen werden konnten (Abbildung 6.14B und 6.15A).

In der elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme (Abbildung 6.16) sind Längsschnitte von zwei Spermienköpfen mit ihrem Nukleus (Nu) und Akrosom (Ak) sowie quer angeschnittene Profile des Hauptstücks (Hs) des Flagellums zu erkennen. Im Flagellum und in den Spermien-freien umgebenden Arealen waren nur vereinzelt

präzipitierte Goldpartikel zu registrieren (Abbildung 6.16, Pfeil in der vergrößerten Abbildung unten rechts). Bei genauerer Betrachtung der Verteilung der Präzipitate in der vergrößerten Mikrographie des Kopfbereiches wird hingegen deutlich, dass eine hohe Konzentration von Immunogoldmarkierungen im Bereich der Akrosomkappe zu detektieren war (Abbildung 6.16, Pfeilspitzen und Sterne). Aufgrund der fehlenden Osmiumoxid-Behandlung bei der Vorbereitung der Spermienpräparate für die Immunogold-Färbung ist eine eindeutige Lokalisierung der inneren und äußeren akrosomalen Membran sowie der Plasmamembran jedoch sehr schwierig (s. Abschnitt 6.2.2). Folglich ist eine exakte Bestimmung der Lokalisation der Goldpartikel im akrosomalen Bereich auf entweder der zytosolischen oder der luminalen Seite der akrosomalen Membran erschwert. Dennoch ist zu erkennen, dass viele immunreaktive Präzipitate in der Nähe der Plasmamembran Perlschnur-artig aufgereiht sind (Pfeilspitzen), während vereinzelte Immunogoldmarkierungen auch in der Nähe des Nukleus (Pfeilspitzen mit Stern) und im Bereich des Akrosoms (Stern) auszumachen sind. Kontrollen ohne Primärantikörperinkubation blieben ohne Immunmarkierung (Abbildung 6.10, [Kontrolle]). Munc13 (Abbildung 6.10, [Munc13-N_{sys}]) und RIM2 sind also beide ultrastrukturell an der Plasmamembran des akrosomalen Bereiches von Mausspermien lokalisiert.

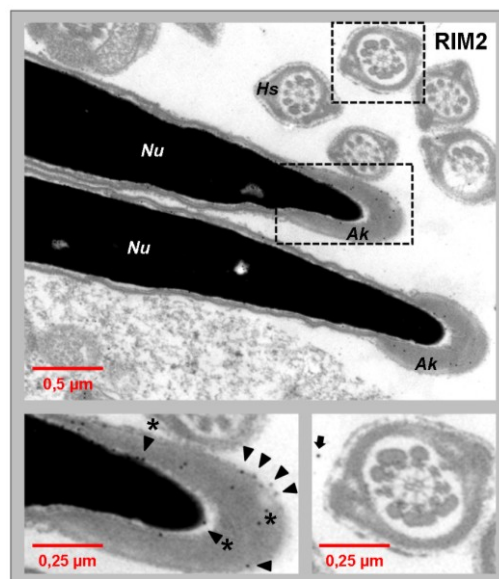


Abbildung 6.16: Elektronenmikroskopische Analyse zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RIM2 in Ultradünnschnitten von Mausspermien.

Mausspermien-Ultradünnschnitte wurden indirekten Immunogold-Färbungen mit einem spezifischen anti-RIM2 Primärantikörper und einem Gold-gekoppelten Sekundärantikörper unterzogen. Der Großteil präzipitierter Goldpartikel war in der anschließenden elektronenmikroskopischen Analyse vor allem in der Nähe der Plasmamembran im Bereich der Akrosomkappe der Spermien zu detektieren (Pfeilspitzen im vergrößerten Ausschnitt unten links), während einige Immunmarkierungen auch in der Umgebung des Nukleus (Pfeilspitzen mit Stern) und innerhalb des akrosomalen Bereichs (Stern) zu erkennen waren. In den die Spermien umgebenden Arealen wurden nur vereinzelte Goldpartikel registriert (Pfeil im vergrößerten Ausschnitt unten rechts). Die durch gestrichelte Rechtecke gekennzeichneten Bereiche sind in den unteren Abbildungen vergrößert dargestellt. Die abgebildeten Mikrographen stellen repräsentative Resultate aus mindestens zwei Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen dar. Ak: Akrosom, Hs: Hauptstück, Nu: Nukleus.

6.3.3 Assoziation der RIM2-Proteine an Detergens-resistente Membranmikrodomänen

In Spermien sind das ubMunc13-2-Protein sowie die Proteine des SNARE-Komplexes, der als Zielstruktur für die Vesikel-*priming*-Funktion der Munc13-Proteine gilt (Betz, Okamoto et al. 1997; Guan, Dai et al. 2008), in Detergens-resistenten Membranmikrodomänen konzentriert (Abbildung 6.11; Tsai, De Vries et al. 2007; Boerke, Tsai et al. 2008; Zitanski, Borth et al. 2010). Da neben der akrosomalen Lokalisation von Munc13 und RIM2 in Spermien (Abbildung 6.9, 6.10 und 6.16) auch eine Assoziation von RIM2 an solche spezialisierten Membranbereiche Hinweise auf ein mögliches funktionelles Zusammenspiel von ubMunc13-2 und RIM2 während der Akrosomreaktion geben könnte, wurde eine potentielle Lokalisation des RIM2-Proteins in aus Spermien isolierten DRM-Fraktionen überprüft.

Dafür wurden aus Rattenspermien hergestellte Membranfraktionen einer Triton X-100-Extraktion unterzogen (Travis, Merdushev et al. 2001) und gleiche Proteinmengen dieser Ausgangsmembranfraktion (P_2) und der beiden resultierenden Membransubfraktionen (DRMs: P_{TX} , solubilisierte Membrankomponenten: S_{TX}) im Immunoblot auf die Verteilung des RIM2-Proteins hin analysiert. Um sicherzustellen, dass die Detergens-Extraktion zu einer Anreicherung von *membrane raft*-assoziierten Membrankomponenten führte, wurde wiederum die Verteilung des *Caveolae*-Markerproteins Caveolin-1 (Krajewska und Maslowska 2004) in den Spermienfraktionen überprüft (s. Abschnitt 6.1.3). Da das Caveolin-1-Immunsignal im direkten Vergleich der drei hergestellten Spermien-Fraktionen am intensivsten in der P_{TX} -Fraktion zu registrieren war, während die S_{TX} -Fraktion kaum Caveolin-1-Immunreaktivität aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass Caveolin-1 enthaltende Membranmikrodomänen in der DRM-Fraktion der Spermien angereichert waren (Abbildung 6.17A, unterer Immunoblot).

Bei der anschließenden Immunoblot-Analyse der drei Fraktionen mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers (Abbildung 6.13) wurde parallel zu den Spermien-Subfraktionen eine P_2 -Fraktion der Rattengroßhirnrinde analysiert, um das apparente Molekulargewicht der immunreaktiven Banden den RIM2-Isoformen zuzuordnen zu können. In der Cortexprobe wurde das für RIM2 charakteristische Leiter-artige Bandenmuster detektiert (Abbildung 6.17A, oberer Immunoblot, [Cortex]) (Khanna, Li et al. 2006; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Drei immunreaktive Banden identischen Molekulargewichts – eine RIM2 α - und zwei RIM2 β -Immunmarkierungen – waren auch in der P_2 - und P_{TX} -Fraktion der Rattenspermien auszumachen (Abbildung 6.17A, [Spermatozoa, P_2 , P_{TX}]), was auf eine Expression derselben RIM2-Isoformen wie im Cortex hindeutet.

Für die Untersuchung der Verteilung der RIM2-immunreaktiven Banden in den Membransubfraktionen der Spermien wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein der

separierten Fraktionen eingesetzt. Bei Betrachtung der Immunoblotanalysen wird deutlich, dass das RIM2 α -Protein in der DRM-Fraktion gegenüber dem Membranausgangsmaterial angereichert vorlag, wohingegen in der S_{TX}-Fraktion kaum RIM2 α -Immunmarkierung detektiert wurde (Abbildung 6.17A, oberer Immunoblot, [Spermatozoa]). Im Gegensatz dazu zeigten die RIM2 β -immunreaktiven Banden nur sehr kleine Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Fraktionen. Damit konnte eine Co-Migration des langen RIM2 α -Proteins, nicht jedoch der verkürzten RIM2 β -Isoformen, mit der Caveolin-1 enthaltenden DRM-Fraktion von Rattenspermien bestätigt werden.

Während der Kapazitation von Spermien kommt es zu einer Reduktion des Netto-Cholesteringehalts der Plasmamembran (Brewis, Moore et al. 2005); allerdings ist davon das in *membrane rafts* eingebundene Cholesterin nicht betroffen (van Gestel, Brewis et al. 2005; Boerke, Tsai et al. 2008). Stattdessen kommt es zu einer Konzentrierung von *membrane rafts* zu größeren Aggregaten (van Gestel, Brewis et al. 2005) und im Zuge dessen auch zu einer Umverteilung von *raft*-assoziierten Proteinen (Cross 2004; Thaler, Thomas et al. 2006). Daher stellte sich als nächstes die Frage, ob die Prozesse der Kapazitation die Assoziation des RIM2-Proteins an Spermien-Membranmikrodomänen beeinflussen könnten. Um dies zu überprüfen, wurden parallel zu den Membranfraktionen nicht kapazitierter Spermien auch Membransubfraktionen aus *in vitro* kapazitierten Spermien hergestellt und im Immunoblot auf die Verteilung der RIM2-Immunmarkierung hin analysiert.

Die vorherige Überprüfung der Isolierung Caveolin-1 enthaltender DRM-Fraktionen bestätigte auch für *in vitro* kapazitierte Rattenspermien eine Assoziation des Caveolin-1-Proteins an die Detergens-unlösliche P_{TX}-Fraktion (Abbildung 6.17B, unterer Immunoblot, [P_{TX}]). Betrachtet man nun die Verteilung der RIM2-Immunreaktivität in den Fraktionen *in vitro* kapazitierter Spermien, ergab sich ein ähnliches Resultat wie in den nicht kapazitierten Spermien (Abbildung 6.17A): In diesen Fraktionen war ebenfalls eine Co-Migration der RIM2 α -Immunreaktivität mit den Caveolin-1 enthaltenden DRM-Komponenten zu beobachten, während kaum eine RIM2 β -Immunreaktivität auszumachen war (Abbildung 6.17B, [Spermatozoa]). Das RIM2 α -Protein ist also sowohl in nicht kapazitierten als auch in kapazitierten Rattenspermien an spezialisierte Membranmikrodomänen, die zur räumlichen Konzentrierung von an Exozytoseprozessen beteiligten Proteinen dienen können (Salaun, James et al. 2004), assoziiert.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten CAZ-Proteine in Spermien zeigten stets eine Assoziation an die Caveolin-1 enthaltende DRM-Fraktion. Um die Spezifität einer solchen Co-Assoziation zu unterstreichen, soll im Folgenden auch ein Gegenbeispiel für ein an der Akrosomreaktion beteiligtes Protein angeführt werden, dessen Expression und Funktion in Spermien bereits beschrieben wurde und das nicht in DRM-Fraktionen angereichert ist, das Munc18-1-Protein (Rodriguez, Zanetti et al. 2012;

Diplomarbeit Laura Vieweg 2010). Munc18-1-Proteine sind zwar Membran-assoziierte Proteine, jedoch migrieren sie in biochemischen Studien sowohl in neuronalem Gewebe als auch in isolierten Spermien hauptsächlich mit der Detergens-löslichen „*non-raft*“ Membransubfraktion (Chamberlain, Burgoyne et al. 2001; Diplomarbeit Laura Vieweg 2010).

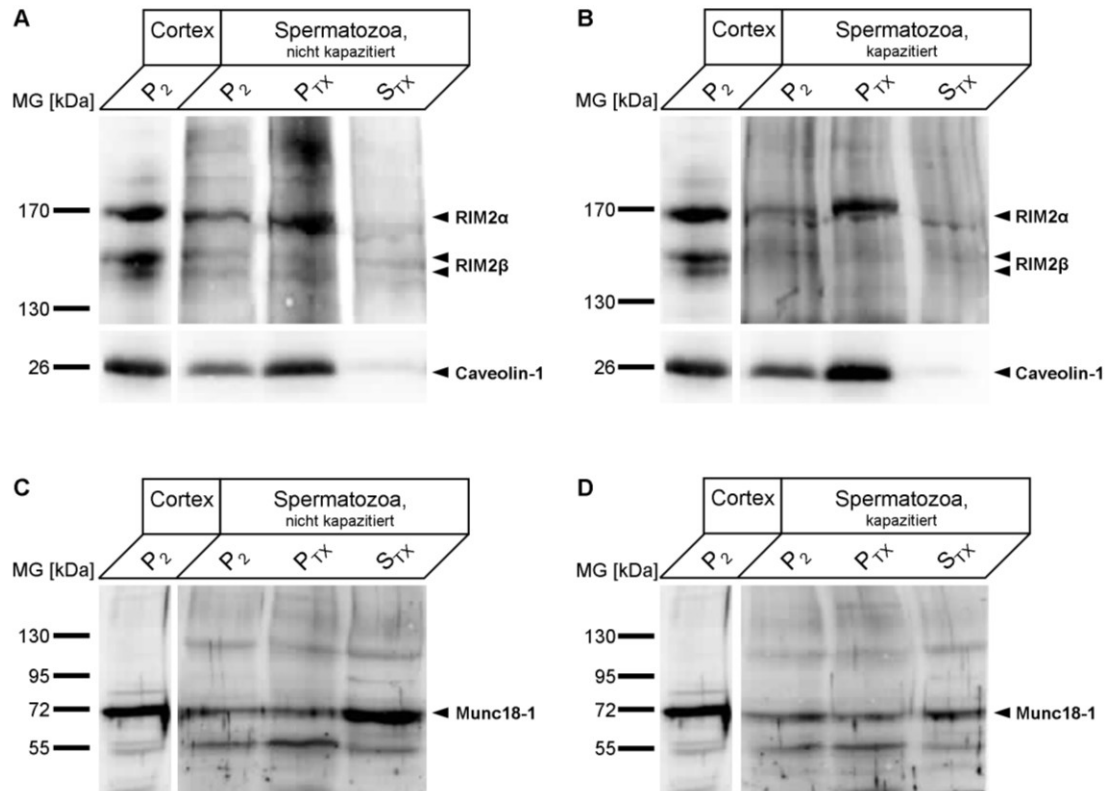


Abbildung 6.17: Lokalisation von RIM2 in Membransubfraktionen nicht kapazitierter und *in vitro* kapazitierter Rattenspermien.

Gleiche Proteinmengen der Membranausgangsfraction [P₂], der DRM-Fraktion [P_{2v}] und der Triton X-100-löslichen Membrankomponenten [S₂] aus epididymalen Rattenspermien [Spermatozoa] wurden im Immunoblot mit Hilfe von Antikörpern analysiert, die RIM2 und Munc18-1 detektieren. Zur Zuordnung des Molekulargewichts der immunreaktiven Banden wurden parallel aus Großhirnrinde der Ratte [Cortex] isolierte P₂-Fraktionen verwendet.

[A] Überprüft man nicht kapazitierte Spermien auf die Verteilung von RIM2 in den verschiedenen Membransubfraktionen, so zeigt sich, dass vor allem RIM2α im Vergleich zur P₂-Fraktion in der P_{2v}-Fraktion angereichert war (oberer Immunoblot) und dort mit dem *Caveolae*-Markerprotein Caveolin-1 (unterer Immunoblot) co-lokalisiert ist. Die Detergens-löslichen Membranbestandteile wiesen hingegen kaum RIM2- und Caveolin-1-Immunreaktivität auf.

[B] Betrachtet man im Vergleich dazu die Verteilung der RIM2-Immunreaktivität in den Membransubfraktionen *in vitro* kapazitierter Spermien, so ist eine Co-Lokalisation von RIM2α und Caveolin-1 in der P_{2v}-Fraktion zu erkennen, die der Assoziation von RIM2α an die *Caveolae*-haltigen DRM-Fractionen der unkapazitierten Spermien [A] entspricht.

[C] Um auszuschließen, dass eine inkorrekte Proteinkonzentrationsbestimmung zu den in [A] dargestellten Befunden geführt hat, wurden die in [A] verwendeten Fraktionen zusätzlich auf die Verteilung des SNARE-Regulators Munc18-1 hin untersucht, der im Gehirn in der *non-raft* Membranfraktion lokalisiert ist. Der anti-Munc18-1 Antikörper markierte in den Spermienfraktionen eine immunreaktive Bande, die dem Molekulargewicht der Cortex-Bande entsprach. Betrachtet man die Verteilung der Munc18-1-Immunmarkierung in den Spermien-Membransubfraktionen, so fällt auf, dass ein deutlich stärkeres Munc18-1-Immunsignal in der S₂- als in der P_{2v}-Fraktion detektiert wurde.

[D] Ein ähnliches Bild ergab sich auch für das Munc18-1-Protein in *in vitro* kapazitierten Spermien: Hier war die Munc18-1-Immunmarkierung ebenfalls in allen drei Fraktionen vorhanden, wobei im Vergleich zu [C] eine geringere Munc18-1-Immunreaktivität in der *non-raft* Fraktion zu beobachten war.

Die gezeigten Immunoblots sind ausgewählte Abbildungen aus mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Größe der genannten Proteine an. Die durch vertikale weiße Linien abgegrenzten Immunoblots befanden sich auf demselben Nitrozellulosebogen, während die durch horizontale weiße Linien abgegrenzten Abbildungen Analysen derselben Fraktionen darstellen, die aufgrund der großen Unterschiede der Molekulargewichte in getrennten Immunoblots untersucht wurden.

Um zu analysieren, welche Verteilung das Munc18-1-Protein in den für die vorangegangenen Versuche eingesetzten Spermienfraktionen (Abbildung 6.17A und B) aufweist, wurden diese im Immunoblot mit Hilfe eines anti-Munc18-1 Antikörpers analysiert. Dabei wurde eine Munc18-1-immunreaktive Bande desselben Molekulargewichts wie im Cortex in der Membranfraktion nicht kapazitierter Spermien detektiert (Abbildung 6.17C, [Spermatozoa, P₂]). Außerdem wurde ein Munc18-1-Immunsignal sowohl in der DRM-Fraktion als auch in der Triton X-100-löslichen Membranfraktion der Spermien registriert (Abbildung 6.17C, [Spermatozoa, P_{TX}, S_{TX}]). Dabei war die Intensität des Munc18-1-Immunsignals in der „*non-raft*“ Fraktion deutlich stärker als in der DRM-Fraktion.

Eine Verteilung der Munc18-1-Immunreaktivität auf alle drei Proben zeigte sich auch in den Fraktionen der *in vitro* kapazitierten Spermien (Abbildung 6.17D, [Spermatozoa]). Allerdings war der Intensitätsunterschied zwischen der P_{TX}- und S_{TX}-Fraktion im Vergleich zu den nicht kapazitierten Spermien geringer. Ungeachtet dessen ist die Munc18-1-Immunreaktivität in den S_{TX}-Fraktionen von nicht kapazitierten und *in vitro* kapazitierten Spermien (Abbildung 6.17C und D) ein Nachweis dafür, dass an der Akrosomreaktion funktionell beteiligte Proteine auch außerhalb von DRMs in Spermien vorkommen. Die beobachtete Co-Migration der ubMunc13-2- und RIM2 α -Immunreaktivität mit der P_{TX}-Fraktion der Spermien (Abbildung 6.11 und 6.17) gibt also einen Hinweis auf eine spezifische Assoziation an Caveolin-1 enthaltende Membranbereiche der Spermien, die für die Funktion der beiden CAZ-Proteine von Bedeutung sein könnte.

6.3.4 Identifizierung von RIM2-Interaktionspartnern im Reproduktionsgewebe

RIM-Proteine zählen zwar, wie die anderen bisher beschriebenen CAZ-Proteine, zu den Gerüstproteinen der aktiven Zone, nehmen jedoch innerhalb dieser Gruppe eine eher aktive und damit zentralere funktionelle Rolle bei der Integration verschiedener Phasen der Neurotransmittervesikel-Exozytose ein (Kaeser 2011). Diese ist u. a. in der Diversität ihrer Interaktionen und damit ihrer Bindungspartner begründet (Sudhof 2012). RIM-Proteine sind z. B. in der Lage über die Bindung an Munc13-Proteine das Vesikel-*priming* zu initiieren (Deng, Kaeser et al. 2011). Außerdem hat sich gezeigt, dass RIM-Proteine die Geschwindigkeit der Neurotransmitter-Sekretion durch die Lokalisation von synaptischen Vesikeln in direkte räumliche Nähe zu den synaptischen Spannungs-abhängigen Calcium-Kanälen (Ca_v-Kanäle) regulieren (Hibino, Pironkova et al. 2002; Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011). Die verschiedenen strukturellen Domänen der langen α RIM-Isoformen, die diese Vielfalt der Bindungspartner erlauben, sind exemplarisch anhand des RIM2 α -Proteins in Abbildung 6.18A schematisch dargestellt.

6.3.4.1 *In vitro* Bindungsstudien von RIM2 und Munc13

Um zu überprüfen, ob RIM2 und Munc13 nicht nur in Neuronen, sondern auch im männlichen Reproduktionsgewebe interagieren können, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit Testislysaten und RIM2-GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Die dafür klonierten RIM2-GST-Konstrukte (s. Abschnitte 4.6 und 5.1) umfassen jeweils ein bis zwei strukturelle RIM2-Domänen mit angrenzenden Aminosäuresequenzen und decken zusammengenommen die gesamte Peptidsequenz des RIM2 α -Proteins ab (Abbildung 6.18B). Für die *in vitro* Interaktionsstudien wurden identische molare Mengen der in *E. coli* Bakterien exprimierten RIM2-GST-Fusionsproteine mit solubilisierten Rattenhoden-Membranfraktionen inkubiert (s. Abschnitte 5.2.5.1 und 5.2.5.2). Anschließend wurden die potentiell aus Testis- und RIM2-GST-Proteinen gebildeten Komplexe affinitätsgereinigt und im Immunoblot mit Hilfe des anti-Munc13-N_{abc} Antikörpers auf die Bindung des testikulären Munc13-1- oder ubMunc13-2-Proteins an die RIM2-GST-Fusionsproteine hin analysiert.

Zunächst musste jedoch ausgeschlossen werden, dass potentielle Interaktionen der Munc13-Proteine mit einem oder mehreren RIM2-GST-Konstrukt/en irrtümlicherweise aufgrund von experimentell bedingten Varianzen bei der Affinitätsreinigung detektiert werden. Dafür wurden die affinitätsgereinigten Hodenprotein-GST-Fusionsprotein-Komplexe mit Hilfe eines Antikörpers analysiert, der das GST-Tag der rekombinanten Proteine erkennt. Aufgrund des im Vergleich zum Munc13-Protein geringen Molekulargewichtes der RIM2-GST-Fusionsproteine waren dafür zusätzlich durchgeführte Immunoblots notwendig. Ein Vergleich der Intensitäten der immunreaktiven Banden erlaubte es anschließend, mögliche Unterschiede in der Beladung der Immunoblotsuren auszumachen und so Rückschlüsse auf die Beladung des Säulenmaterials bei der Affinitätsreinigung zu ziehen. Außerdem wurde der Nitrozellulosebogen mit dem Protein-bindenden Farbstoff Ponceau S gefärbt (Rice und Hammer 1969). Die Intensität der roten Färbung der Spuren ermöglicht es ebenfalls ungleiche Beladungen des Säulenmaterials zu erkennen. Beide Ladekontrollen wiesen ähnlich stark gefärbte bzw. immunmarkierte Banden der RIM2-GST-Fusionsproteine auf (nicht gezeigt). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass auch nach der Affinitätsreinigung gleiche Mengen der eingesetzten RIM2-GST-Fusionsproteine in der SDS-PAGE separiert wurden.

Um das Molekulargewicht potentiell gebundener Proteine direkt mit dem der testikulären Munc13-Isoformen vergleichen zu können und gleichzeitig die erfolgte Solubilisierung zu überprüfen, wurde auch das eingesetzte Testislysat im Immunoblot analysiert. Dabei waren ein starkes ubMunc13-2-Immunsignal und eine schwächere Munc13-1-Markierung in der solubilisierten Membranfraktion des Rattenhodens auszumachen (Abbildung 6.18C, [Testislysat]).

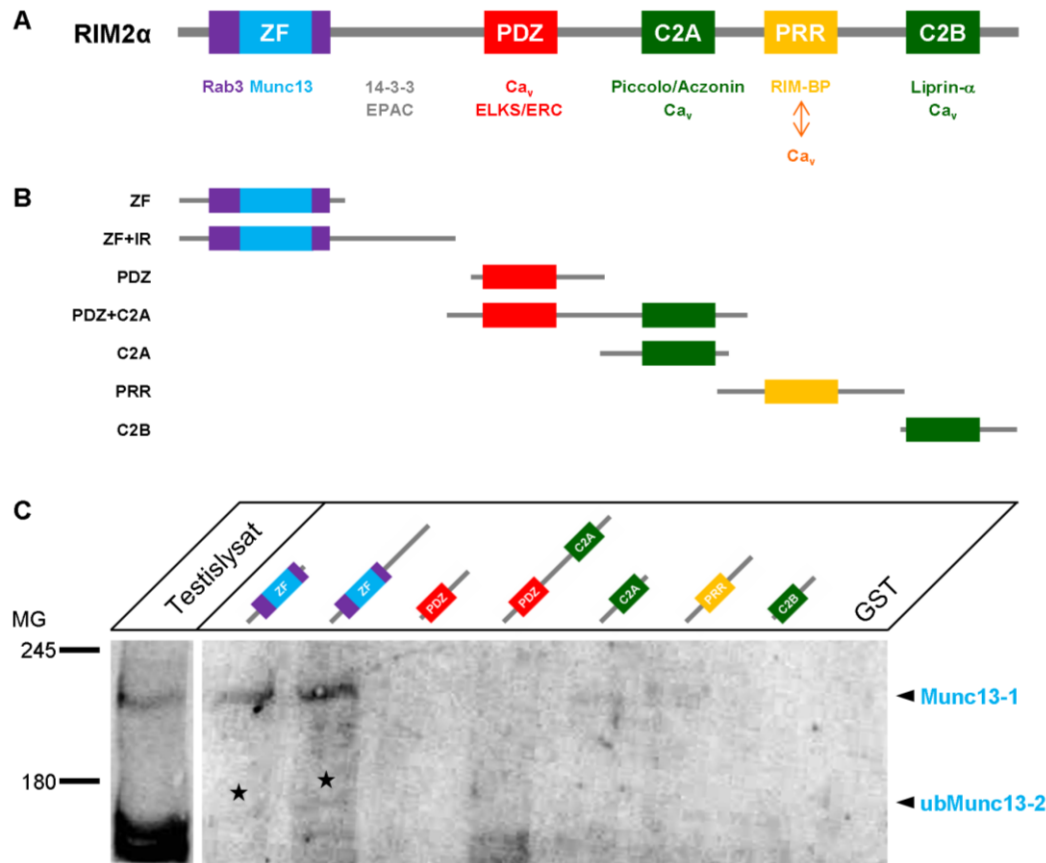


Abbildung 6.18: *In vitro* Bindungsstudien von testikulärem Munc13 an RIM2-GST-Fusionsproteine.

[A] Unterhalb der schematischen Darstellung der strukturellen Domänen des RIM2 α -Proteins sind die bisher identifizierten Interaktionspartner der jeweiligen Domäne in der korrespondierenden Farbe aufgeführt (zur Übersicht s. (Schoch und Gundelfinger 2006; Sudhof 2012). Indirekte Bindungen über Brückenproteine sind durch Pfeile markiert. Strukturelle Domänen sind als farbige Quader (für Erläuterungen s. Legende von Abbildung 3.8), das Polypeptidrückgrat ist als grauer Balken dargestellt.

[B] Die Konstrukte der in [C] verwendeten RIM2-GST-Fusionsproteine decken überlappende Bereiche der gesamten RIM2-Aminosäuresequenz ab, wie die schematische Darstellung ihrer Ausdehnung in Relation zur Domänenstruktur des RIM2-Proteins in [A] veranschaulicht. ZF+IR: Zinkfingermotiv mit intermediärer Region zwischen Zinkfinger- und PDZ-Domäne.

[C] Um zu untersuchen, ob testikuläres Munc13 an RIM2 binden kann, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit Membranlysaten aus Rattenhoden [Testislysat] und gleichen molaren Mengen der in [B] dargestellten RIM2-GST-Fusionsproteine durchgeführt. Die affinitätsgereinigten Komplexe wurden anschließend im Immunoblot mit Hilfe des anti-Munc13-N_{term}-Antikörpers auf die Bindung testikulären Munc13-Proteins an die RIM2-GST-Fusionsproteine hin analysiert. Um die Zuordnung des Molekulargewichts detektierter Banden zu erleichtern, wurde parallel die eingesetzte solubilisierete Testis-Membranfraktion analysiert, die ein starkes ubMunc13-2-Immunsignal und eine etwas schwächere Munc13-1-immunreaktive Bande aufwies. Die Analyse der RIM2-GST-Proteinkomplexe zeigte trotz des asymmetrischen Laufverhaltens des SDS-PAGE-Gels eine schwache Co-Präzipitation von ubMunc13-2 (durch Sterne hervorgehoben) und eine deutlich stärkere Bindung von Munc13-1 an die beiden RIM2-Konstrukte, die die Zinkfinger-Domäne enthalten [ZF, ZF+IR].

Die durch vertikale weiße Linien abgegrenzten Spuren befanden sich auf demselben Nitrozellulosebogen, wurden bei der Detektion jedoch unterschiedlich lang belichtet. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Masse der Munc13-Isoformen an. Der ausgewählte Immunoblot zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus vier Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen. GST: nicht fusionierte Glutathion S-Transferase.

Betrachtet man die Munc13-Immunreaktivität der RIM2-GST-Fusionsprotein-Komplexe im Vergleich zum Testislysat, waren Munc13-immunreaktive Banden ausschließlich in den beiden Spuren der Fusionsproteine zu detektieren, die die N-terminale Zinkfingerdomäne von RIM2 enthalten (Abbildung 6.18C, [ZF] und [ZF+IR]). Die anderen RIM2-GST-Fusionsproteine und die Negativkontrolle, bei der lediglich aufgereinigte, unfusionierte Glutathion S-Transferase zu den Lysaten gegeben wurde,

zeigten hingegen keine Munc13-Immunmarkierung. Obwohl im verwendeten Testislysat eine deutlich stärkere ubMunc13-2-Immunreaktivität zu beobachten war (Abbildung 6.18C, [Testislysat]), konnten in den Spuren der ZF-Domäne hauptsächlich Immunsignale registriert werden, die dem Molekulargewicht von Munc13-1 im Lysat des Rattenhoden entsprachen. Trotz des asymmetrischen Laufverhaltens der unteren Bereiche des SDS-PAGE-Gels war jedoch auch eine sehr schwache Bindung von ubMunc13-2 an dieselben RIM2-Konstrukte zu erkennen (Abbildung 6.18C, Sterne). Insgesamt lässt sich festhalten, dass testikuläre Munc13-1- und ubMunc13-2-Proteine analog zu den neuronalen Isoformen an die ZF-Domäne des RIM2-Proteins binden können, die für die Aktivierung der Vesikel-*priming*-Funktion der Munc13-Proteine in Synapsen verantwortlich ist (Deng, Kaeser et al. 2011).

6.3.4.2 Untersuchung der Interaktion von RIM2 und RIM-BP3

Neben der Aktivierung des Vesikel-*primings* an der neuronalen Synapse (Deng, Kaeser et al. 2011) können RIM-Proteine auch noch weitere Parameter der Vesikelfusion beeinflussen, wie z. B. die Geschwindigkeit der Exozytose (Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011). Da RIM-Proteine mit ihren vielfältigen Interaktionsdomänen der Gruppe der Gerüstproteine angehören (Huber 2001), erfüllen sie diese modulierenden Funktionen ebenfalls durch die Bindung an ihre entsprechenden Interaktionspartner. RIM-Proteine rekrutieren z. B. synaptische Vesikel in die unmittelbare Nähe von präsynaptischen Ca_v -Kanälen, sodass einströmendes Calcium ohne Zeitverlust durch Diffusion das vesikuläre Calcium-Sensorprotein Synaptotagmin erreichen kann (Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011). Die Interaktion von RIM-Proteinen und Ca_v -Kanälen erfolgt dabei über einen trimeren Komplex, der sowohl über die direkte Bindung von RIM-Proteinen an Ca_v -Kanäle als auch über die Interaktion von RIM-Proteinen mit RIM-BPs, die wiederum an Ca_v -Kanäle binden, zustande kommt (Hibino, Pironkova et al. 2002; Han, Kaeser et al. 2011).

Um zu untersuchen, ob RIM-Proteine und Ca_v -Kanäle auch im männlichen Reproduktionssystem interagieren können, was einen Hinweis auf eine mögliche Calcium-Einstrom-regulierende Funktion der RIM-Proteine bei der akrosomalen Exozytose liefern könnte, wurden sowohl Co-Immunpräzipitationsstudien als auch *in vitro* Bindungsstudien mit den oben beschriebenen RIM2-GST-Fusionsproteinen (Abbildung 6.18B) durchgeführt. Da sich Calciumkanäle durch die Vielzahl (insgesamt 24) ihrer lipophilen Transmembrandomänen (Neely und Hidalgo 2014) nur sehr schwer aus dem Gewebe solubilisieren lassen, müssen entsprechend hohe Detergens-Konzentrationen verwendet werden (Berkefeld, Fakler et al. 2010). Hohe Detergens-Konzentrationen beeinflussen allerdings nicht nur die Protein-Lipid-Interaktion, sondern können auch die zu analysierenden Protein-Protein-Interaktionen beeinträchtigen (Yang, Zhang et al. 2009). Daher führten die biochemischen Studien leider zu keinem überzeugenden Interaktionsnachweis.

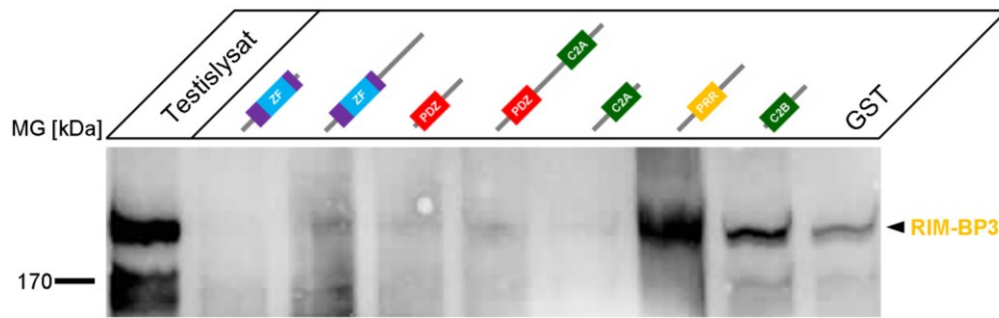


Abbildung 6.19: *In vitro* Bindungsstudien von RIM2-GST-Fusionsproteinen und testikulärem RIM-BP3.

Zur Überprüfung, ob testikuläres RIM-BP3 an RIM2 binden kann, wurden solubilisierete Hoden-Membranfraktionen mit gleichen molaren Mengen der in Abbildung 6.18B dargestellten RIM2-GST-Fusionsproteine inkubiert, potentielle Proteinkomplexe affinitätsgeklärt und mit Hilfe der Immunoblot-Technik analysiert. Der verwendete anti-RIM-BP3 Antikörper detektierte im eingesetzten Hodenlysat [Testislysat] eine stark immunreaktive Bande mit einem Molekulargewicht, das der apparenten molekularen Masse von RIM-BP3 entspricht (Zhou, Du et al. 2009). Ein ebenfalls starkes Immunsignal desselben Molekulargewichts wurde in der Spur des RIM2-GST-Fusionsproteins registriert, das die Prolin-reichen Region [PRR] von RIM2 enthält. Zusätzliche, deutlich schwächere RIM-BP3-Immunsignale wurden zudem in den Spuren des RIM2-C2B-Konstrukts [C2B] und der Kontrolle der unfusionierten Glutathion S-Transferase [GST] beobachtet. Um sicherzugehen, dass die Menge der affinitätsgeklärten GST-Fusionsproteine in allen Ansätzen gleich war, wurden Aliquots der präzipitierten Ansätze in zusätzlichen Immunoblots mit einem anti-GST Antikörper analysiert und mit Ponceau S gefärbt (nicht gezeigt). Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; der Pfeil auf der rechten Seite deutet die molekulare Größe des RIM-BP3-Proteins an. Der ausgewählte Immunoblot zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens zwei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen. GST: nicht fusionierte Glutathion S-Transferase.

In einem alternativen Ansatz wurde deshalb analysiert, ob eine etwaige Interaktion von RIM2 mit den RIM-Bindeproteinen nachzuweisen ist. In ihrer Funktion als zusätzliche „Brückenproteine“ zwischen RIM-Proteinen und Ca_v -Kanälen (Hibino, Pironkova et al. 2002; Han, Kaeser et al. 2011) können Letztere einen Hinweis auf einen potentiellen trimeren RIM-RIM-BP-Calciumkanal-Komplex geben. Die vorherrschende RIM-BP-Isoform im Hoden ist das RIM-BP3 (Mittelstaedt und Schoch 2007; Zhou, Du et al. 2009), für das bislang lediglich aufgrund von Sequenzhomologien angenommen wird, dass es an RIM-Proteine binden kann (Mittelstaedt und Schoch 2007). Für die Überprüfung der RIM-BP3-Bindung an RIM2 wurden erneut *in vitro* Bindungsstudien mit solubilisierten Rattenhoden-Membranfraktionen und den rekombinanten RIM2-GST-Proteinen durchgeführt. Dabei belegten die entsprechenden Ladekontrollen (Ponceau S-Färbung und Immunoblot-Nachweis mit Hilfe des anti-GST Antikörpers), dass gleiche Mengen der RIM2-GST-Fusionsproteine in allen Ansätzen eingesetzt wurden (nicht gezeigt).

Die Komplexe aus Hodenproteinen und RIM2-GST-Fusionsproteinen wurden im Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen anti-RIM-BP3 Antikörpers analysiert (Zhou, Du et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass im verwendeten Testislysat eine immunreaktive Bande zu erkennen war (Abbildung 6.19), die dem beschriebenen apparenten Molekulargewicht von RIM-BP3 entspricht (Zhou, Du et al. 2009). Die Analyse der Verteilung der RIM-BP3-Immunreaktivität in den RIM2-GST-Protein-Präzipitaten ergab, dass vor allem das Fusionsprotein der Prolin-reichen Region von RIM2 eine intensive RIM-BP3-Immunmarkierung aufwies (Abbildung 6.19, [PRR]). Jedoch waren auch RIM-BP3-Immunsignale in der Spur der C2B-Domäne und der

unfusionierten Glutathion S-Transferase zu erkennen. Diese fielen im Vergleich zur starken RIM-BP3-Immunmarkierung des RIM2-GST-Konstrukts mit der Prolin-reichen Region allerdings beide deutlich schwächer aus (Abbildung 6.19, [C2B] und [GST]).

Es lässt sich festhalten, dass eine Bindung von testikulärem RIM-BP3 an das RIM2-Protein zu beobachten war, wobei die Interaktion im Wesentlichen auf die Prolin-reiche Region von RIM2 konzentriert war. Diese Region fungiert als Bindungsmodul, das auch die Interaktion von RIM-BP1 und RIM-BP2 mit den RIM-Proteinen vermittelt (Wang, Sugita et al. 2000; Hibino, Pironkova et al. 2002).

6.3.5 Funktionelle Bedeutung verschiedener struktureller RIM-Domänen für die Akrosomreaktion

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Munc13 und RIM-BP3 als testikuläre Interaktionspartner des RIM2-Proteins identifiziert werden (Abbildung 6.18 und 6.19). Aufgrund der funktionellen Rolle von RIM-Proteinen an der Präsynapse (Sudhof 2012) ist daher eine Analyse der funktionellen Bedeutung der einzelnen RIM2-Interaktionsdomänen für die Akrosomreaktion interessant. Frühere Befunde konnten bereits erste Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung des RIM2-Proteins während der Calcium-vermittelten Akrosomreaktion geben (Diplomarbeit Nele Zitanski, 2008). Dabei wurde allerdings keine systematische Analyse der einzelnen RIM2-Bindungsdomänen für die mittlerweile beschriebenen Interaktionspartner durchgeführt. Dabei wurde lediglich der inhibitorische Effekt eines Antikörpers, der eine Region um die PDZ-Domäne von RIM2 erkennt (anti-RIM2 PDZ) und eines Antikörpers, der sowohl RIM1 als auch RIM2 bindet (anti-RIM1/2 ZF), auf die Calcium-induzierte akrosomale Exozytose bestimmt. Der Effekt auf die spontane Akrosomreaktion wurde bisher noch nicht überprüft.

In dieser Arbeit wurde analog zu den Untersuchungen für Munc13 und Piccolo/Aczonin die funktionelle Rolle der RIM2-Bindungsdomänen während der Akrosomreaktion mit Hilfe von SLO-permeabilisierten Spermien analysiert. Dafür wurden die Spermien mit inhibitorisch wirkenden, spezifische Domänen bindenden anti-RIM Antikörpern beladen (Hutt, Baltz et al. 2005). So war eine umfassende Analyse und Interpretation der funktionellen Bedeutung einzelner Protein-Interaktionsdomänen des RIM2-Proteins möglich. Dabei wurden die Auswirkungen der Antikörper-Vorinkubation sowohl auf spontane Exozytoseereignisse (Akrosomreaktionsrate) als auch auf die Calcium-induzierte Akrosomreaktion (Akrosomreaktionsindex) quantifiziert (Tabelle 6.1). Für die Analysen wurden drei verschiedene Antikörper eingesetzt, die distinkte Interaktionsdomänen des RIM2-Proteins binden: Erstens wurde der o. g. anti-RIM1/2 ZF Antikörper verwendet, der die N-terminalen Rab3- und Munc13-Bindedomänen von RIM1 und RIM2 erkennt (Abbildung 6.20A; Wang, Okamoto et al. 1997; Betz, Thakur et al. 2001). Zweitens kam

der anti-RIM2 PDZ Antikörper zum Einsatz, der die zentralen Interaktionsdomänen für u. a. die Ca_v -Kanäle (Kaeser, Deng et al. 2011) und die CAZ-Proteine ELKS/ERC (Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002) und Piccolo/Aczonin (Fujimoto, Shibasaki et al. 2002) bindet (Abbildung 6.20A). Und drittens wurde ein spezifischer anti-RIM2 Antikörper appliziert, der einen Bereich von RIM2 detektiert (Aminosäuren 925 bis 1114 von RIM2), der partiell mit den Aminosäuresequenzen überlappt, die für die Interaktion mit den RIM-BPs verantwortlich sind (Aminosäuren 1097 bis 1149 von RIM2) (Wang, Sugita et al. 2000; Abbildung 6.20A, [anti-RIM2]).

Betrachtet man die Effekte der Antikörper-Applikation auf die spontane, durch die Kapazitation und/oder Permeabilisierung ausgelöste Akrosomreaktion der Spermien, so wird deutlich, dass die Inhibition des/der RIM-Protein/e keine signifikanten Veränderungen der spontanen akrosomalen Exozytoserate zur Folge hatte: Abbildung 6.20B zeigt, dass die mit den Antikörpern inkubierten Spermien eine vergleichbare Rate der spontanen Akrosomreaktion aufwiesen ([anti-RIM1/2 ZF]: $28,70 \pm 3,0 \%$, [anti-RIM2 PDZ]: $32,03 \pm 2,64 \%$, [anti-RIM2]: $31,08 \pm 2,63 \%$) wie die Spermien, die nicht mit Antikörpern beladen wurden ([Kontrolle]: $30,98 \pm 2,57 \%$). Neben dieser Negativkontrolle wurde in jeder Versuchsreihe eine Positivkontrolle mitgeführt (Tabelle 6.1), deren Akrosomreaktionsrate nach Zugabe von CaCl_2 in einer Endkonzentration von 10 mM quantifiziert wurde. Die Exozytoserate der Positivkontrolle betrug in dieser Versuchsreihe im Mittel $46,71 \pm 2,04 \%$ (Abbildung 6.20B, [Calcium]).

Für die Analyse der Effekte der verschiedenen Antikörper auf die Calcium-vermittelte akrosomale Exozytose wurden die Akrosomreaktionsindices berechnet (s. Abschnitt 5.3.3.1). Die Inhibition der verschiedenen RIM-Domänen durch die unterschiedlichen Antikörper führte zu einer vergleichbaren, jeweils signifikanten Inhibition der Calcium-vermittelten Akrosomreaktion im Vergleich zur Calcium-stimulierten Positivkontrolle ohne Antikörperinkubation (Abbildung 6.20C, [Calcium]: 100 %). Die Spermien, die mit dem anti-RIM1/2 ZF Antikörper inkubiert wurden, der die Rab3- und Munc13-Bindedomänen von RIM1 und RIM2 erkennt (www.sysy.com; Dulubova, Lou et al. 2005), zeigten einen signifikant verringerten Akrosomreaktionsindex von im Mittel $60,42 \pm 11,29 \%$ (Abbildung 6.20C, [anti-RIM1/2 ZF]). Bei Betrachtung der Akrosomreaktionsindices der anderen beiden Antikörper fällt auf, dass sowohl der anti-RIM2 PDZ Antikörper, der die Ca_v -Kanal- und ELKS/ERC-bindende RIM2-Domäne detektiert (Abbildung 6.20C, [anti-RIM2 PDZ]: $47,93 \pm 18,97 \%$) als auch das spezifische anti-RIM2 IgG, das einen Teil der RIM-BP3-Bindedomäne erkennt (Abbildung 6.20C, [anti-RIM2]: $52,87 \pm 14,70 \%$), zu einer ähnlich starken, im Vergleich zur Positivkontrolle signifikanten Inhibition der Calcium-stimulierten Akrosomreaktion führten.

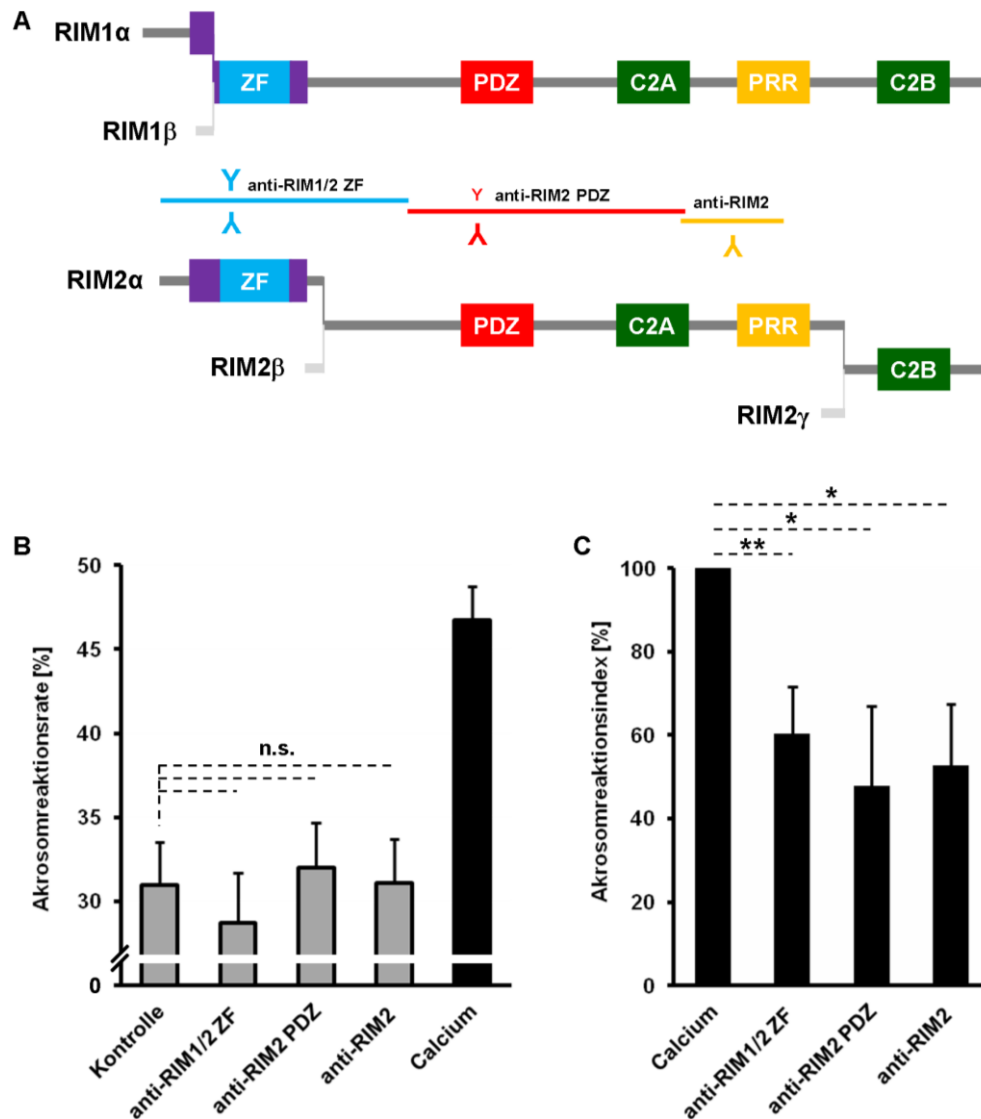


Abbildung 6.20: Funktionelle Bedeutung verschiedener RIM-Domänen für die Akrosomreaktion.

[A] Die Position der immunogenen Peptidsequenzen (farbige Balken), die von den in [B] und [C] verwendeten Antikörpern detektiert werden, sind in Relation zur schematischen Darstellung der Domänenstruktur der α RIM-Proteine veranschaulicht. Der anti-RIM1/2 ZF Antikörper detektiert den N-Terminus von sowohl RIM1 α als auch RIM2 α (Antikörpersymbole, Υ), während der anti-RIM2 PDZ Antikörper die PDZ- und C2A-Domänen hauptsächlich von RIM2 erkennt und zusätzlich eine schwache Kreuzreaktivität zu RIM1 aufweist (www.sysy.com, kleines Antikörpersymbol, γ). Der dritte Antikörper ist der spezifische anti-RIM2 Antikörper, der einen Bereich vor und in der Prolin-reichen Region von RIM2 erkennt. Strukturelle Domänen sind als farbige Quader (für Erläuterungen s. Legende von Abbildung 3.8), das Polypeptidrückgrat ist als grauer Balken dargestellt.

[B] Um zu analysieren, ob die Inhibition einzelner Interaktionsdomänen der RIM-Proteine spontane akrosomale Exozytoseprozesse beeinflussen kann, wurden SLO-permeabilisierte Balb/C Mausspermien mit den in [A] beschriebenen Antikörpern inkubiert. Die basale spontane Exozytoserate wurde in einer Negativkontrolle ohne Antikörperinkubation ermittelt [Kontrolle], während die Permeabilisierung der Spermienmembran in einer Positivkontrolle durch die Zugabe von CaCl₂ (Endkonzentration 10 mM) überprüft wurde [Calcium]. Nach der Antikörper-Inkubation unterschied sich die spontane Akrosomreaktionsrate der Spermien nicht signifikant von der Spontanrate der Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten \pm SEM von 8 unabhängigen Spermienpräparationen. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. n.s.: nicht signifikant.

[C] Die Funktion der verschiedenen RIM-Domänen während der Calcium-induzierten Akrosomreaktion wurde ebenfalls an permeabilisierten, mit den in [A] beschriebenen Antikörpern vorinkubierten Spermien untersucht, die anschließend mit sättigenden Konzentrationen CaCl₂ (10 mM) stimuliert wurden. Alle drei anti-RIM-Antikörper zeigten eine signifikante, vergleichbar starke Reduktion der Akrosomreaktionsindices gegenüber der Positivkontrolle [Calcium]. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsindices (s. Abschnitt 5.3.3.1) \pm SEM von 8 Versuchsreihen mit unabhängigen Spermienpräparationen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt und sind mit **: $p < 0,01$ und *: $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Die alleinige Inhibition des RIM2-Proteins mit Hilfe des anti-RIM2 Antikörpers führte zu einer vergleichbaren Reduzierung des Akrosomreaktionsindex wie die simultane Inhibition der Zinkfingerdomänen beider α -RIM-Proteine durch den anti-RIM1/2 ZF Antikörper. Dieser auffällige Befund deutet auf die besondere funktionelle Bedeutung speziell des RIM2-Proteins hin. Die ebenfalls vergleichbaren Effekte der Inhibition aller untersuchten RIM2-Domänen legen darüber hinaus nahe, dass sowohl die mit Munc13 und Rab3 interagierenden N-terminalen RIM2-Domänen (Dulubova, Lou et al. 2005), die nur im RIM2 α -Protein vorhanden sind (Abbildung 6.20A), als auch die mit Ca_v-Kanälen (Kaeser, Deng et al. 2011), ELKS/ERC-Proteinen (Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002) und RIM-BP3 (Abbildung 6.19) interagierenden RIM2-Domänen für die Calcium-abhängige Akrosomreaktion essentiell sind.

6.3.6 Reproduktionsbiologische Charakterisierung eines RIM2 α -defizienten Mausmodells

Da die funktionellen Analysen an permeabilisierten Spermien einen Hinweis darauf geben, dass vor allem das RIM2 α -Protein von Bedeutung für die Calcium-regulierte Akrosomreaktion ist (s. Abschnitt 6.3.5), wurde die physiologische Relevanz dieser Isoform in einem RIM2 α -defizienten Mausmodell untersucht. RIM2 α -defiziente Mäuse zeugen unter den artifiziellen Haltungsbedingungen einer Tierzuchtanlage zwar Nachwuchs; jedoch bleibt bei 50 % der Verpaarungen von männlichen Mäusen, die für drei der vier α Rims-Allele defizient sind (RIM1 α +/-RIM2 α -/- und RIM1 α -/-RIM2 α +/-), der Nachwuchs vollständig aus (ca. 20 Prozentpunkte) oder es werden deutlich seltener und damit weniger Nachkommen gezeugt (ca. 30 Prozentpunkte; persönliche Mitteilung Prof. Dr. Susanne Schoch, Institut für Neuropathologie und Epileptologie des Universitätsklinikums Bonn). Da Doppel-*knockout*-Mäuse, die für alle vier α RIM-Allele defizient sind, nicht lebensfähig sind (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006), wurde untersucht, ob das Fehlen der prädominanten Spermien- α RIM-Isoform, des RIM2 α -Proteins, möglicherweise zu Aberrationen des Reproduktionssystems im Allgemeinen und/oder zu Veränderungen der Akrosomreaktion im Speziellen führt.

6.3.6.1 Überprüfung der Gen-Defizienz und Lokalisation residualer RIM-Proteine im RIM2 α -defizienten Hodengewebe

Zunächst sollte die Gen-Defizienz der RIM2 α -*knockout*-Tiere im Reproduktionssystem auf Proteinebene überprüft werden. Dazu wurden identische Proteinmengen von aus Wildtyp und RIM2 α -defizienten Mäusen isolierten Hoden-Membranfraktionen im Immunoblot analysiert. Der dabei verwendete spezifische anti-RIM2 Antikörper detektiert sowohl RIM2 α als auch RIM2 β (Abbildung 6.20A), die von unabhängigen Promotoren generiert werden (Wang und Sudhof 2003). Daher sind immunreaktive Banden im RIM2 α -defizienten Gewebe der residualen RIM2 β -Isoform zuzuordnen.

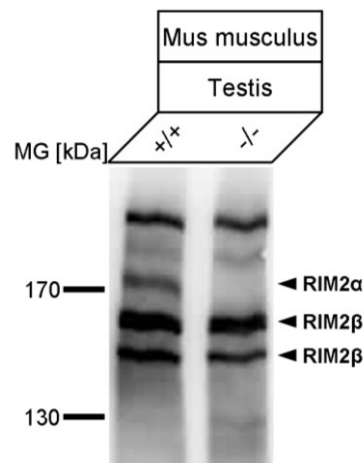


Abbildung 6.21: Immunoblotanalyse zur Überprüfung der RIM2 α -Protein-Defizienz im Hodengewebe RIM2 α -defizienter Mäuse.

Gleiche Proteinmengen von Membranfraktionen aus Hodengewebe von RIM2 α -defizienten Mäusen [-/-] und Wildtyptieren [+/+] wurden mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers im Immunoblot analysiert. Im Wildtyp-Hoden konnte dabei eine einzelne RIM2 α -immunreaktive Bande nachgewiesen werden, die im *knockout*-Gewebe nicht detektierbar war, wohingegen weitere immunreaktive Banden keine Unterschiede in der Stärke der Immunreaktivität zwischen Wildtyp- und Gen-defizientem Mausgewebe zeigten und daher auf die Existenz verschiedener *Splice*-Varianten der RIM2 β -Isoform im Hoden hinweisen. Das Molekulargewicht in kDa ist für den jeweiligen Immunoblot links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite markieren die molekulare Masse der RIM2-Isoformen. Die ausgewählten Immunoblots zeigen repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Gewebepräparationen.

In der Fraktion des Wildtyp-Hodengewebes wurden unerwartet immunreaktive Banden mit einem für RIM2-Proteine zu großen Molekulargewicht (ca. 200 kDa) detektiert, bei denen es sich potentiell um trotz der SDS-Behandlung nicht gelöste heteromere Komplexe der RIM2 β -Proteine handeln könnte (Linderoth, Model et al. 1996; Tsai, Garcia-Gil et al. 2010). Zusätzlich wurden aber auch Immunsignale detektiert (Abbildung 6.21, [+/+]), die, verglichen mit Wildtyp-Enzephalonproben (Abbildung 6.14A, [+/+]), in etwa der apparenten molekularen Masse der RIM2-Proteine entsprechen. Die Intensität von zwei immunreaktiven Banden mit einer molekularen Masse von 150 – 160 kDa in den Wildtyp- (+/+) und RIM2 α -defizienten (-/-) Hodengewebeproben waren vergleichbar stark und konnten somit verschiedenen *Splice*-Varianten der RIM2 β -Isoform zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu konnte in der Fraktion des Wildtyp-Testis eine einzelne immunreaktive Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 175 kDa registriert werden, die im *knockout*-Gewebe nicht detektierbar war (Abbildung 6.21). Demnach konnte für das Hodengewebe der RIM2 α -defizienten Tiere die Abwesenheit des RIM2 α -Proteins belegt werden. Außerdem ist ersichtlich, dass im RIM2 α -defizienten Keimdrüsengewebe keine stärkere Immunmarkierung der RIM2 β -Isoform zu verzeichnen war als in Proben aus Wildtyp-Hoden.

Um zu prüfen, ob die im Immunoblot detektierten *Splice*-Varianten der RIM2 β -Isoform (Abbildung 6.21) eine potentielle Funktion von RIM2 α im männlichen Reproduktionssystem von RIM2 α -defizienten Mäusen möglicherweise kompensieren könnten, wurde analysiert, ob die RIM2 β -Varianten überhaupt dieselbe subzelluläre Lokalisation aufweisen wie das RIM2 α -Protein. Da bislang leider keine spezifischen

anti-RIM2 β Antikörper verfügbar sind, wurde dies in immunhistochemischen Färbungen an Hodenschnitten von *knockout*-Mäusen überprüft, die für die RIM2 α -Isoform defizient sind. In diesen Färbungen wäre eine detektierbare RIM2-Immunmarkierung des verwendeten spezifischen anti-RIM2 Antikörpers (Abbildung 6.20A) aufgrund des fehlenden RIM2 α -Proteins auf die Anwesenheit des RIM2 β -Proteins zurückzuführen.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, in welcher Keimzellpopulation von Wildtyp-Hodenschnitten überhaupt eine RIM2-Immunmarkierung nachzuweisen ist. Hierzu wurden chromogene immunhistochemische Färbungen von Wildtyp-Hodenschnitten mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers durchgeführt. Jedoch zeigten diese Analysen, wie schon die immunzytochemischen Färbungen der Spermien mit demselben Antikörper (s. Abschnitt 6.3.2), keinen reproduzierbaren Immunnachweis des RIM2-Proteins (nicht gezeigt). Deshalb wurden die Färbungen der Wildtyp-Hodenschnitte mit dem anti-RIM2 Antikörper wiederholt, der eine leichte Kreuzreaktivität zu RIM1 aufweist (anti-RIM2 PDZ, Abbildung 6.20A). Diese schwache Kreuzreaktivität birgt jedoch den Nachteil, dass eine Immunmarkierung des *knockout*-Gewebes möglicherweise auch auf das RIM1-Protein zurückzuführen sein könnte. Da für beide α RIM-Isoformen defiziente Tiere nicht lebensfähig sind (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006), wurden daher zur Analyse der Lokalisation der RIM2 β -Varianten Hodenschnitte von Mäusen verwendet, denen zusätzlich zum RIM2 α -Protein ein Allel des *Rims1 α* -Gens fehlt (RIM1 α +/- RIM2 α -/-).

Abbildung 6.22A zeigt die schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen *Tubulus seminiferus* einer Wildtyp-Maus, bei dem die „Schichtung“ der konzentrischen Ringe mit den verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen zu erkennen ist. Die Vorläuferzellen (Spermatogonien) liegen nahe der äußeren Basalmembran, die das Hodenkanälchen umgibt, während die Zellen der folgenden, reiferen Entwicklungsstadien zunehmend in Richtung Tubulushumen lokalisiert sind. Dabei unterscheidet man zwischen den noch großen Spermatozyten, aus denen sich die deutlich kleineren, luminal lokalisierten Spermatiden entwickeln. Sobald diese die Kondensation ihres Zellkerns und die Ausbildung von Akrosom und Flagellum abgeschlossen haben, werden die Spermien in das Lumen des Kanals freigesetzt (Handel 1987; Cheng und Mruk 2012).

Im Wildtyp-Hodenschnitt war nach Applikation des anti-RIM2 PDZ Antikörpers zum einen eine schwache, diffuse Braunfärbung des umgesetzten DAB-Substrats im gesamten Schnitt detektierbar (Abbildung 6.22B). Diese war trotz der Blockierung der Aktivität von im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen (s. Abschnitt 5.2.7.3) zu verzeichnen. Auffällig war jedoch eine viel stärkere, sichelförmige Immunmarkierung, die dem blau gefärbten Zellkern der Spermatozyten aufsaß. Sie ist aufgrund der Lokalisation der Vorläuferstruktur des Akrosoms zuzuordnen (Abbildung 6.22B, [RIM1 α ++ RIM2 α ++], Pfeilspitzen). Diese Markierung der präakrosomalen Strukturen,

die sich sehr deutlich von der diffusen Hintergrundfärbung abhebt, deutet darauf hin, dass von einer Konzentrierung des RIM-Proteins im Bereich der präakrosomalen Strukturen auszugehen ist. Die Immunmarkierung des Testis von RIM2 α -defizienten, für das *Rims1a*-Gen heterozygoten Mäusen glich den Färbungen der Wildtyp-Hoden bis ins Detail. Die diffuse Hintergrundfärbung war hier ebenso zu beobachten wie die sehr starke, sichelförmige Markierung der akrosomalen Vorläuferstrukturen der Spermatozyten (Abbildung 6.22D, [RIM1 α +/- RIM2 α -/-], Pfeilspitzen). Die Kontrollfärbungen, bei denen die Wildtyp- und *knockout*-Hodenschnitte nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, zeigten hingegen keine Braunfärbung (Abbildung 6.22C und E, [Kontrolle]).

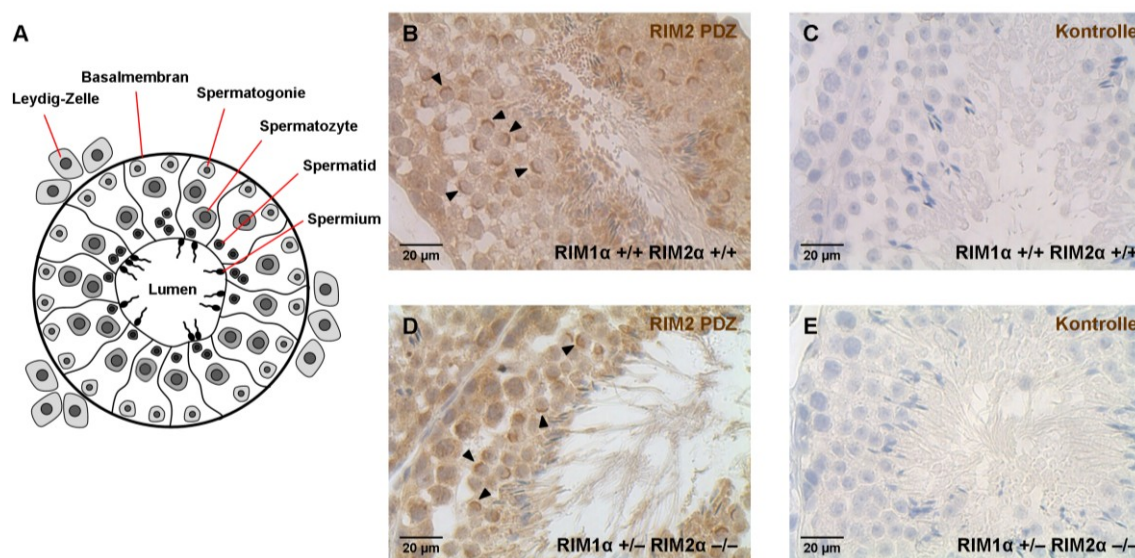


Abbildung 6.22: Immunhistochemische Analyse der Testes von Wildtyp- und RIM1 α +/- RIM2 α -/- Mäusen.

Die Expression und subzelluläre Lokalisation der RIM2 β -Isoform im RIM2 α -*knockout*-Gewebe wurde in immunhistochemischen Analysen mit Hilfe eines anti-RIM2 Antikörpers untersucht, der eine schwache Kreuzreaktivität zu RIM1 aufweist [RIM2 PDZ] (www.sysy.com). Daher wurden Hodenschnitte von RIM2 α -defizienten, für das *Rims1a*-Gen heterozygoten Mäusen [RIM1 α +/- RIM2 α -/-] im Vergleich zu Wildtyp-Hoden [RIM1 α +/+ RIM2 α +/] analysiert. Gebundener Antikörper ist durch eine Braunfärbung zu erkennen, wohingegen die Zellkerne mit Hämalaun blau gefärbt wurden.

[A] Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen *Tubulus seminiferus*, auf dem die verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermienvorläuferzellen angedeutet sind: Außerhalb der Tubuli im Interstitium sind die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen lokalisiert, nahe der Basalmembran in der Tubulusperipherie befinden sich die Spermatogonien, in den mittleren Bereichen die Spermatozyten und im luminalen Bereich des Hodenepithels die Spermatiden. Die Spermatozoa werden in das Lumen des Hodenkanälchens abgegeben. Abbildung in Anlehnung an Dissertation Dorke Meyer 2013.

[B] Im Wildtyp-Hodengewebe war neben der schwachen Hintergrundfärbung aller Zellen eine differenzierte RIM2-Immunmarkierung in den Spermatozyten als sichelförmige Braunfärbung von präakrosomalen Strukturen zu verzeichnen, die dem Zellkern aufsitzen (Pfeilspitzen).

[C] Die Kontrollfärbung des Wildtyp-Hoden, bei der die Inkubation mit dem Primärantikörper unterblieb, zeigte keine braune Immunmarkierung.

[D] Die immunhistochemische Analyse von RIM1 α +/- RIM2 α -/- Hodengewebeschnitten führte zu einer analogen sichelförmigen Immunmarkierung der präakrosomalen Strukturen der Spermatozyten (Pfeilspitzen) und diffusen Hintergrundfärbung des gesamten Epithels wie im Wildtyp-Gewebe [A].

[E] Die Kontrollfärbung ohne Primärantikörperinkubation zeigte kein braunes Immunsignal der RIM1 α +/- RIM2 α -/- Hodenschnitte.

Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentative Resultate aus mindestens zwei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen.

Der Immunoblot in Abbildung 6.21 konnte mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers verifizieren, dass das RIM2 α -Protein im RIM2 α -*knockout*-Hodengewebe nicht vorhanden ist. Die RIM2 β -Isoformen waren hingegen sowohl im Wildtyp- als auch im RIM2 α -defizienten Gewebe nachweisbar. In dem für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten RIM1 α +/- RIM2 α -/- Hodengewebe ist aufgrund des einen fehlenden *Rims1 α* -Allels lediglich weniger RIM1 α - und auch RIM1 β -Protein zu erwarten. Daher ist die Immunmarkierung des verwendeten anti-RIM2 PDZ Antikörpers in den RIM1 α +/- RIM2 α -/- Hodenschnitten nur zum Teil auf die Lokalisation der RIM2 β -Isoformen zurückzuführen. Da aber auch keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des Immunsignals zwischen Wildtyp- und *knockout*-Hodengewebe registriert wurden, konnte für alle detektierten RIM-Isoformen dieselbe subzelluläre Lokalisation im Bereich der präakrosomalen Strukturen der Spermatozyten festgestellt werden.

6.3.6.2 Analyse von Reproduktions-relevanten anatomischen und morphologischen Parametern der RIM2 α -defizienten Mauslinie

Im RIM-BP3-defizienten Mausmodell wurden Beeinträchtigungen der Spermatogenese beobachtet, die sowohl zu einer geringeren Anzahl gebildeter Spermien als auch zu morphologisch deformierten Keimzellen führen (Zhou, Du et al. 2009). Analog dazu sollte überprüft werden, ob die Defizienz für das RIM2 α -Protein, dessen funktionelle Rolle für die Calcium-induzierte Akrosomreaktion essentiell ist (s. Abschnitt 6.3.5), ähnliche Auswirkungen auf die Spermatogenese haben könnte. Hierzu wurden anatomische und morphologische Parameter des Reproduktionssystems von RIM2 α -defizienten Tieren bestimmt und mit denen von Wildtyp-Mäusen verglichen.

Zum einen wurde die Masse beider Hoden von gleichaltrigen Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Tieren direkt im Anschluss an die Präparation bestimmt. Im Mittel betrug das Gewicht der Hoden von RIM2 α -defizienten Mäusen $220,82 \pm 7,12$ mg (Abbildung 6.23A, [-/-]) und unterschied sich damit nicht signifikant von dem der Wildtyp-Tiere ([+/-]: $211,25 \pm 5,35$ mg). Zum anderen wurde die Anzahl reifer motiler Spermien, die im caudalen Bereich des Nebenhodens gespeichert sind, für beide Genotypen ausgezählt. Dabei zeigten Wildtyp- und RIM2 α -defiziente Mäuse gleichen Alters ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6.23B, [+/-]: $23,92 \pm 3,97 \times 10^6$ Spermien/Tier; [-/-]: $25,58 \pm 2,46 \times 10^6$ Spermien/Tier).

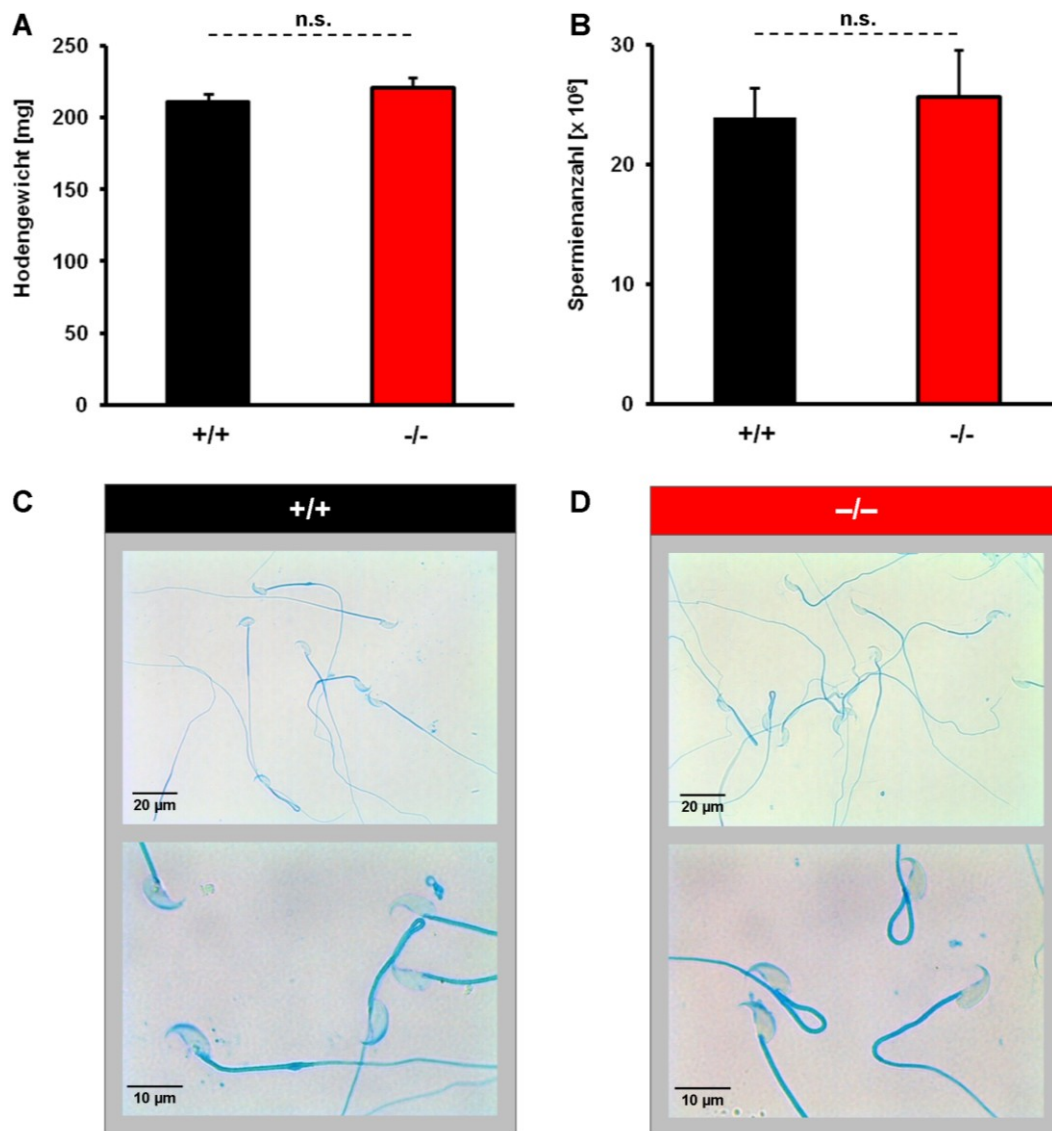


Abbildung 6.23: Testis und Spermatozoa von RIM2 α -defizienten und Wildtyp-Mäusen im Vergleich.

[A] Die Gewichtsbestimmung der Hoden von Wildtyp- [-/-] und RIM2 α -defizienten [+/+] Mäusen erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation. Die Quantifizierung ergab, dass sich die Hodengewichte von Gen-defizienten und Wildtyp-Tieren nicht signifikant unterschieden. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM von 17 RIM2 α -defizienten und 16 gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen.

[B] Nach der Präparation der Caudae epididymidium wurden diese eingeschnitten und ein Herausschwimmen der Spermien in den umgebenden Kapazitationspuffer für 90 Minuten erlaubt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Anzahl motiler Spermien pro RIM2 α -defizienter bzw. Wildtyp-Maus quantifiziert. Zwischen der Spermienanzahl von Wildtyp- und *knockout*-Tieren wurde kein signifikanter Unterschied registriert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM von 11 RIM2 α -defizienten und 12 gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen.

[C] Zur Analyse der Morphologie von Wildtyp-Spermien wurden diese einer Coomassie-Färbung unterzogen. Die obere mikroskopische Aufnahme zeigt die Übersicht einiger Spermien, die in ihrer gesamten Länge zu sehen sind. Die untere Abbildung zeigt eine höhere Vergrößerung der Morphologie der Spermienköpfe.

[D] Zur Analyse potentieller morphologischer Unterschiede wurden die aus RIM2 α -defizienten Tieren gewonnenen und mit Coomassie gefärbten Spermien mit denen der Wildtyp-Tiere [C] verglichen. Dabei zeigten sich weder auffällige Unterschiede in der Gesamtmorphologie der Spermien (obere Abbildung), noch der Spermienköpfe (untere Abbildung).

Die statistische Analyse der Daten in [A] und [B] erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für nicht gepaarte Stichproben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. n.s.: nicht signifikant. Die Mikrographen in [C] und [D] sind repräsentative Resultate von drei Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen.

Wie oben erwähnt weisen RIM-BP3-defiziente Spermien deformierte Spermienköpfe auf, die sich von der typischen Halbmondform der Wildtyp-Mausspermienköpfe eindeutig unterscheiden lassen (Zhou, Du et al. 2009). Um festzustellen, ob eine

ähnlich starke Abweichung von der normalen Spermienmorphologie auch in den Spermien der RIM2 α -defizienten Tiere zu beobachten ist, wurden Coomassie-Färbungen von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien durchgeführt. Bei der lichtmikroskopischen Analyse zeigten die Spermien beider Genotypen jedoch keine auffälligen morphologischen Unterschiede (Abbildung 6.23C und D, obere Teilabbildungen). Auch die Vergrößerung der Spermienköpfe zeigte eine normal ausgeprägte, halbmondförmige Kopfmorphologie der RIM2 α -defizienten Spermien, die sich augenscheinlich nicht von der der Wildtyp-Spermien unterschied (Abbildung 6.23C und D, untere Teilbilder).

Insgesamt konnten weder morphologische Auffälligkeiten der Spermien selbst, noch signifikante Unterschiede in der Hodengröße oder der Anzahl motiler Spermien in den RIM2 α -defizienten Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen festgestellt werden.

6.3.6.3 Vergleich der spontanen Akrosomreaktionsrate von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien

Zur Analyse, ob die *Rims2 α* -Gen-Defizienz Auswirkungen auf die akrosomale Exozytose der Spermien haben könnte, wurde sowohl die spontane als auch die Calcium-induzierte Akrosomreaktionsrate bestimmt. Dazu wurden zunächst die spontanen Exozytoseereignisse im zeitlichen Verlauf von 120 Minuten *in vitro* Kapazitation quantitativ erfasst, wobei Wildtyp- und RIM2 α -defiziente Spermien parallel analysiert wurden. Dafür wurden der jeweiligen Spermien suspension direkt nach der Präparation und in der darauffolgenden Inkubationszeit im Abstand von je 30 Minuten ein Aliquot entnommen, die Zellen fixiert und der akrosomale Status der Spermien bestimmt (s. Abschnitt 5.3.3.2). Die Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten der Keimzellen eines Genotyps zu einem Zeitpunkt wurden anschließend gegen die Zeit aufgetragen.

Bei Betrachtung der Graphen fällt zunächst auf, dass sowohl die Akrosomreaktionsraten der Wildtyp- als auch die der RIM2 α -*knockout*-Spermien erwartungsgemäß mit der Zeit stiegen (Abbildung 6.24; Sebkova, Ded et al. 2014). Der dimensionslose Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) wurde daraufhin als Maß für den linearen Zusammenhang zwischen der Exozytoserate und der Zeit mit Hilfe der Prism Software (Graphpad) berechnet. Beträgt er 1 oder -1, sind die beiden betrachteten Merkmale vollständig positiv bzw. negativ korreliert. Wenn r einen Wert von 0 annimmt, besteht keine lineare Abhängigkeit. Für die Wildtyp-Spermien war eine signifikante, positiv lineare Korrelation von Kapazitationszeit und Anstieg der Akrosomreaktionsrate zu verzeichnen (Abbildung 6.24, [+/+]: $r=0,92$). Ebenso war die Akrosomreaktionsrate der RIM2 α -defizienten Spermien von der Kapazitationszeit positiv linear abhängig (Abbildung 6.24, [-/-]: $r=0,92$).

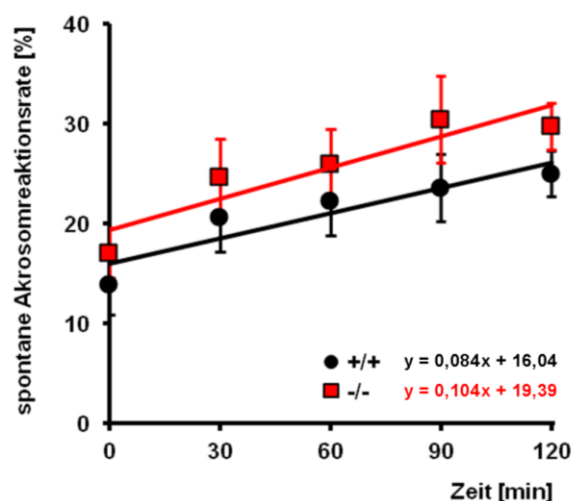


Abbildung 6.24: Spontane Akrosomreaktionsrate von RIM2 α -defizienten und Wildtyp-Spermien.

Um Unterschiede in der spontanen Akrosomreaktionsrate zwischen RIM2 α -defizienten [-/-] und Wildtyp-Spermien [+/+] festzustellen, wurde die jeweilige Akrosomreaktionsrate gegen die Kapazitationszeit der Spermien aufgetragen. Anschließend wurde den beiden Datenreihen eine lineare Regressionsgerade angepasst. Die spontane Exozytoserate beider Genotypen stieg mit der Zeit kontinuierlich an, wobei die Mittelwerte der Exozytoseraten der RIM2 α -defizienten Spermien stets über denen der Wildtyp-Spermien lagen. Die statistische Analyse zeigt, dass die Steigung beider Graphen sich nicht signifikant unterschied. Dagegen war der Y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden der RIM2 α -defizienten Spermien gegenüber dem der Wildtyp-Spermien signifikant erhöht ($p=0,028$), was eine initial höhere Tendenz zur spontanen akrosomalen Exozytose zeigt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten \pm SEM von 17 RIM2 α -defizienten und 16 gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Die Regressionsgeraden wurden in Excel (Microsoft) erstellt; ihre statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Prism Software (Graphpad). Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Aufgrund dieser linearen Korrelation kann der Anstieg der Akrosomreaktionsraten beider Genotypen mit Hilfe von linearen Regressionsgeraden dargestellt und bestimmt werden. Anhand der Daten lassen sich außerdem Unterschiede von Y-Achsenabschnitt und Steigung der beiden Regressionsgeraden berechnen. Zwischen der Steigung der Regressionsgeraden der spontanen Akrosomreaktionsraten von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 6.24, $p=0,69$). Im Gegensatz dazu war der Y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden der *knockout*-Spermien signifikant größer als der der Wildtyp-Spermien (Abbildung 6.24, $p=0,028$). In diesem signifikanten Unterschied spiegelt sich die Beobachtung wider, dass alle Mittelwerte der spontanen Akrosomreaktionsraten der RIM2 α -defizienten Spermien höher waren als die der Wildtyp-Spermien, auch wenn die gemittelten Werte eines Zeitpunktes keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen aufwiesen.

Die epididymalen RIM2 α -defizienten Spermien zeigen also bereits initial, Kapazitations-unabhängig eine höhere Tendenz zur spontanen akrosomalen Exozytose als Wildtyp-Spermien, was möglicherweise auf kompensatorische Effekte residualer anderer RIM-Subtypen (RIM2 β und/oder RIM1 β) zurückzuführen sein könnte (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Die kontinuierliche Zunahme des Prozentsatzes Akrosom-reagierter Spermien beider Genotypen hingegen war über die Kapazitationszeit vergleichbar.

6.3.6.4 Analyse der Calcium-Ionophor- und *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion von RIM2 α -defizienten Mausspermien

Für die Untersuchung der möglichen Auswirkungen der RIM2 α -Defizienz auf die Calcium-induzierte Akrosomreaktion wurden Wildtyp- und RIM2 α -defiziente Spermien parallel mit dem Calcium-Ionophor A23187 inkubiert und ihr akrosomaler Status anschließend bestimmt. A23187 bildet für Calcium-Ionen permeable Poren in Membranen aus und erlaubt so den freien Fluss von Calcium-Ionen über die Plasmamembran in das Zytoplasma der Spermien, sofern ein Calcium-Konzentrationsgradient besteht (Brucker und Lipford 1995; Liu und Baker 1996; Kirkman-Brown, Punt et al. 2002).

Da lediglich die direkt durch Calcium induzierte Akrosomreaktion zwischen den beiden Genotypen verglichen werden sollte, war es notwendig, die potentiell kompensatorischen Effekte anderer RIM-Isoformen während der spontanen Akrosomreaktion der epididymalen RIM2 α -defizienten Spermien (s. Abschnitt 6.3.6.3) bei der Auswertung auszuklammern. Deshalb wurden die erhaltenen Werte jeweils als Vielfaches der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO im Kapazitationspuffer) dargestellt. Die faktischen Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten der DMSO-Kontrollproben von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien betrugen dabei im Mittel $18,90 \pm 1,22$ % bzw. $24,41 \pm 3,60$ %.

Die Potenzierung der Akrosomreaktionsrate (AR) durch Inkubation der Wildtyp-Spermien mit dem Calcium-Ionophor A23187 betrug das $3,10 \pm 0,39$ -fache der Exozytoserate der Kontrolle (Abbildung 6.25A, [+/, A23187]). Betrachtet man im Vergleich dazu die Potenzierung der Akrosomreaktion der RIM2 α -defizienten Spermien, wird deutlich, dass eine leicht, jedoch nicht signifikant verringerte Induktion der Akrosomreaktion nach Stimulation der *knockout*-Spermien mit dem Calcium-Ionophor zu verzeichnen war (Abbildung 6.25A, [-/-]: $2,78 \pm 0,39$). Dies ist besonders erwähnenswert, da die anti-RIM Antikörper zuvor eine signifikante Inhibition der Calcium-vermittelten Exozytose bewirkten (Abbildung 6.20C). Die registrierte leicht reduzierte akrosomale Exozytose der RIM2 α -*knockout* Spermien nach Inkubation mit A23187 bestätigt tendentiell diesen Befund. Es ist jedoch zu beachten, dass die verwendeten inhibitorischen Antikörper nicht allein das RIM2 α -Protein, sondern auch die weiteren, in Mausspermien exprimierten RIM2 β *Splice*-Varianten (Abbildung 6.14) und teilweise auch RIM1 binden und damit inhibieren können (Abbildung 6.20A). Außerdem kann die freie Verfügbarkeit von Calcium im Zytoplasma der Spermien, wie ein Calcium-Ionophor sie ermöglicht (Brucker und Lipford 1995; Liu und Baker 1996; Kirkman-Brown, Punt et al. 2002), dazu führen, dass die möglicherweise spezifisch durch RIM2 α vermittelten Regulationsmechanismen der räumlich und zeitlich koordinierten Aktivierung der multiplen Membranfusion während der

Akrosomreaktion umgangen werden (Kirkman-Brown, Punt et al. 2002; Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009). Deshalb war es notwendig, RIM2 α -defiziente Spermien zusätzlich auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, ihren akrosomalen Inhalt auf einen physiologischen Stimulus, die *Zona pellucida*, hin freizusetzen.

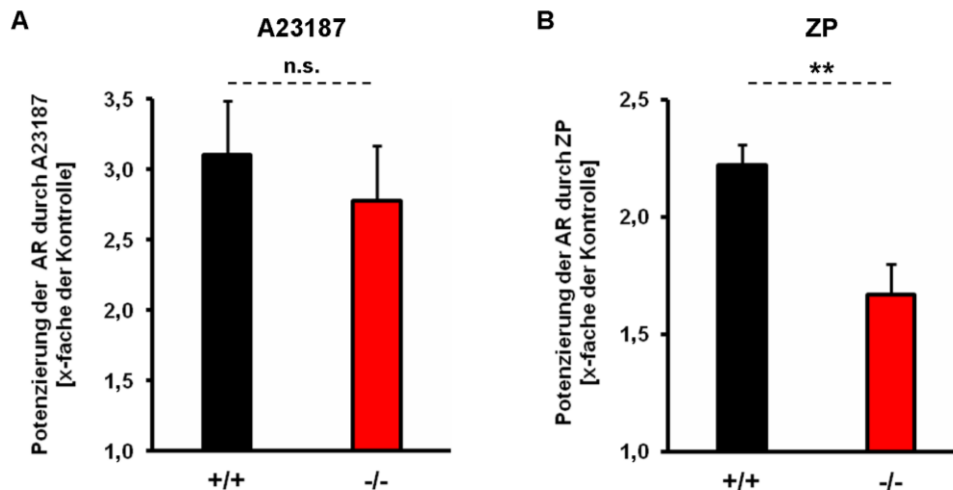


Abbildung 6.25: Untersuchung der Calcium- und der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien.

[A] Für die Analyse, ob RIM2 α -defiziente [-/-] und Wildtyp- [+/+] Spermien Unterschiede in der Calcium-abhängigen akrosomalen Exozytose aufweisen, wurden *in vitro* kapazitierte Spermien beider Genotypen mit dem Calciumionophor A23187 inkubiert und anschließend die Akrosomreaktionsrate (AR) quantifiziert [A23187]. Potentielle unspezifische Effekte von DMSO, das zur Lösung des Ionophors eingesetzt werden musste, sind in Kontrollansätzen erfasst worden, in denen der KRB-Puffer mit der entsprechenden DMSO-Konzentration (0,1 %) versetzt wurde. Die Potenzierung der Akrosomreaktionsrate der Wildtyp-Spermien (schwarze Balken) durch A23187 war leicht, jedoch nicht signifikant (n.s.) höher als die der RIM2 α -knockout Spermien (rote Balken). Die Ergebnisse sind Mittelwerte des Vielfachen der AR der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle \pm SEM von 11 Wildtyp und 9 gleichaltrigen RIM2 α -defizienten Versuchstieren.

[B] Um zu untersuchen, ob RIM2 α -defiziente Spermien Veränderungen der *Zona pellucida*-induzierten Akrosomreaktion aufweisen, wurde die akrosomale Exozytose von Wildtyp- und *knockout*-Spermien nach Stimulation mit solubilisierter *Zona pellucida* [ZP] quantifiziert. Außerdem wurden Kontrollansätze mit einem identischen Volumen *Zona*-freien Puffers versetzt (s. Text). Es zeigte sich, dass die durch ZP hervorgerufene Potenzierung der Akrosomreaktionsrate in den RIM2 α -defizienten Spermien (rote Balken) im Vergleich zu Wildtyp-Spermien (schwarze Balken) signifikant reduziert war. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM des Vielfachen der Akrosomreaktionsrate (AR) der jeweiligen Pufferkontrolle von 11 Wildtyp- und 8 gleichaltrigen RIM2 α -defizienten Versuchstieren.

Die statistische Analyse erfolgte mittels eines zweiseitigen studentischen T-Tests für nicht gepaarte Stichproben. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und ist mit **: p < 0,01 gekennzeichnet.

Zur Isolation der *Zonae pellucidae* wurden weiblichen Mäusen die Ovarien entnommen und die *Zonae* zunächst mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konzentriert, bevor sie für die Stimulation der Spermien durch eine Verschiebung des pH-Wertes solubilisiert wurden (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009; s. Abschnitt 5.3.5.1). Wildtyp- und RIM2 α -defiziente Spermien wurden dann parallel mit der gleichen Konzentration gelöster *Zonae pellucidae* inkubiert. Anschließend wurde die akrosomale Exozytoserate quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich jeweils eine Spermienprobe jedes Genotyps mit dem für die *Zona*-Solubilisierung verwendeten Puffer inkubiert. Im Mittel betrug die spontane Exozytoserate der Wildtyp-Spermien-Kontrolle $19,27 \pm 1,03$ %. Die spontane Akrosomreaktionsrate der Kontrollprobe der RIM2 α -knockout Spermien lag im Mittel bei $25,23 \pm 3,05$ % und spiegelt die erhöhte

Tendenz zur spontanen Akrosomreaktion wider (s. Abschnitt 6.3.6.3). Um potentiell kompensatorische Effekte anderer RIM-Proteine während der spontanen Akrosomreaktion (s. Abschnitt 6.3.6.3) nicht in die Bewertung der Daten einzubeziehen, wurde die *Zona pellucida*-induzierte akrosomale Exozytose als Vielfaches der Akrosomreaktionsrate der Kontrollansätze dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation der Wildtyp-Spermien mit solubilisierter *Zona pellucida* (Abbildung 6.25B, [+/, ZP]: $2,22 \pm 0,09$) eine etwas geringere Potenzierung der Akrosomreaktion zur Folge hatte als die Stimulation mit dem Calcium-Ionophor (Abbildung 6.25A, [+/, A23187]). Außerdem fällt auf, dass die Induktion der *Zona pellucida*-stimulierten Akrosomreaktion der RIM2 α -defizienten Spermien (Abbildung 6.25B, [-/-, ZP]: $1,67 \pm 0,13$) noch deutlich kleiner war als die der Wildtyp-Spermien. Vergleicht man die Potenzierung der Akrosomreaktionsraten der *knockout*- und Wildtyp-Spermien, so war eine signifikante Reduzierung der Exozytose der RIM2 α -defizienten Spermien nach *Zona pellucida*-Stimulation um ca. 45 % zu verzeichnen.

Die *Rims2 α* -Gen-Defizienz hatte also nur eine leichte Reduzierung der akrosomalen Exozytose zur Folge, sofern Calcium-Ionen innerhalb der Zelle im Überschuss verfügbar waren. Jedoch zeigten die RIM2 α -defizienten Spermien ein deutliches Defizit in der räumlich gerichteten, zeitlich koordinierten Membranfusion während der Akrosomreaktion, wie sie durch einen physiologischen Stimulus, die *Zona pellucida* der Eizelle, hervorgerufen wird (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009).

6.3.7 RIM2 als zentrales Bindeglied der akrosomalen Synapse

6.3.7.1 Massenspektrometrische Analysen zur Identifikation von weiteren testikulären RIM2-Bindungspartnern

An der neuronalen Synapse nehmen die RIM-Proteine aufgrund ihrer vielfältigen Interaktionspartner eine zentrale, regulierende Rolle für die Exozytose von synaptischen Vesikeln ein und sind dadurch ein wichtiger Knotenpunkt des CAZ-Proteinnetzwerkes (Schoch, Gundelfinger 2006). Um zu prüfen, ob RIM-Proteine möglicherweise in Spermien auch am Aufbau eines solchen Proteinnetzwerkes beteiligt sind, sollte analysiert werden, ob weitere bereits identifizierte Interaktionspartner von RIM-Proteinen mit testikulärem RIM2 interagieren. Dafür wurden Immunpräzipitationen mit dem spezifizierten anti-RIM2 Antikörper (Abbildung 6.20) durchgeführt und die co-präzipitierten Proteine in massenspektrometrischen Analysen identifiziert.

Zunächst wurde verifiziert, ob durch die Immunpräzipitation mit dem Isoform-selektiven anti-RIM2 Antikörper eine Anreicherung von RIM2-Protein aus dem Solubilisat des Rattenhoden erfolgt war. Hierfür wurden sowohl die affinitätsgereinigten Immunpräzipitate als auch das verwendete Hodensolubilisat in

Immunoblot-Analysen mit Hilfe desselben anti-RIM2 Antikörpers analysiert. In parallel durchgeführten Negativkontrollen wurden statt des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers auch Antikörper aus Normalserum nicht immunisierter Kaninchen (Kaninchen IgG) zur Immunpräzipitation eingesetzt.

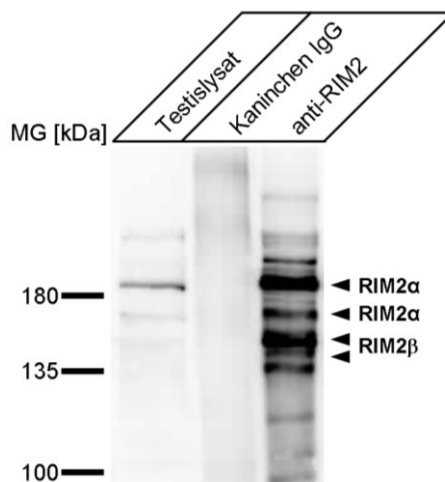


Abbildung 6.26: Immunpräzipitation von RIM2 aus Rattenhodenlysat.

Für die Identifikation von testikulären RIM2-Bindungspartnern in massenspektrometrischen Analysen wurde das RIM2-Protein zusammen mit seinen endogenen Bindungspartnern aus solubilisiertem Rattenhoden affinitätsgereinigt. Neben den präzipitierten Proteinen wurde außerdem das für die Immunpräzipitationen verwendete Hodensolubilisat [Testislysat] im Immunblot mit Hilfe des anti-RIM2 Antikörpers analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation mit dem spezifischen anti-RIM2 Antikörper [anti-RIM2] wurden parallel dazu Präzipitate hergestellt, bei denen die unspezifische Bindung an Kontrollantikörper [Kaninchen IgG] überprüft wurde, die in Spezies und Isoform mit dem anti-RIM2 Antikörper übereinstimmen. Der repräsentative Immunoblot zeigt, dass das verwendete Testislysat eine schwache RIM2-Immunreaktivität aufwies, wohingegen das Immunpräzipitat des anti-RIM2 Antikörpers eine sehr viel stärkere RIM2-Immunmarkierung zeigte. Das Eluat der Kontrolle mit Kaninchen IgGs zeigte dagegen keine RIM2-Immunreaktivität. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Größe der genannten RIM2-Isoformen an. Der ausgewählte Immunoblot zeigt eine repräsentative Abbildung der zwei in der Massenspektrometrie analysierten Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen.

Im verwendeten Hodenlysat wurden mehrere schwache RIM2 α - und RIM2 β -Immunsignale detektiert (Abbildung 6.26, [Testislysat]). Immunmarkierungen desselben Molekulargewichts waren auch nach der Immunpräzipitation mit dem anti-RIM2 Antikörper zu beobachten (Abbildung 6.26, [anti-RIM2]), wohingegen im Präzipitat des Kontrollantikörpers keine immunreaktiven Banden zu erkennen waren (Kaninchen IgG). Dieser Vergleich der beiden Immunpräzipitate verdeutlicht, dass RIM2-Proteine spezifisch nur mit Hilfe des anti-RIM2 Antikörpers präzipitiert wurden. Darüber hinaus waren die detektierten RIM2-Immunmarkierungen in der Spur des anti-RIM2 Antikörpers stärker als die des eingesetzten Testislysats, was den Schluss zulässt, dass die RIM2-Proteine nach der Immunpräzipitation deutlich konzentrierter vorlagen.

Die Immunpräzipitate des anti-RIM2 Antikörpers und der Kontrollantikörper wurden anschließend tryptisch verdaut (s. Abschnitt 5.2.5.4) und die erhaltenen Peptide massenspektrometrischen Analysen unterzogen (Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Fecher-Trost, Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der

Universität des Saarlandes). Diese Analysen erfolgten jeweils sowohl für die Eluate der Immunpräzipitationen des anti-RIM2 als auch des Kaninchen IgGs von je zwei unabhängigen, parallel durchgeführten Versuchsansätzen. Für die Auswertung wurde ein Co-Präzipitat von RIM2 als solches eingestuft, wenn Peptide des Proteins entweder im mindestens fünffachen Überschuss in der RIM2-Immunpräzipitation gegenüber der des Kontrollantikörpers vorhanden waren oder mindestens zwei Peptide in der RIM2-Probe identifiziert wurden, sofern in der Negativkontrolle keine Peptide dieses Proteins detektiert wurden (Fujiwara, Uemura et al. 2014; s. Abschnitt 5.2.5.4; persönliche Mitteilung Dr. Claudia Fecher-Trost).

In der massenspektrometrischen Analyse der RIM2-Immunpräzipitationen wurden neben dem RIM2-Protein, dessen Peptide in den zwei durchgeführten Immunpräzipitationen in großen Mengen vorhanden waren (Tabelle 6.2, # 3), Peptide von weiteren 547 Proteinen identifiziert. Tabelle 6.2 fasst eine Auswahl der Proteine zusammen, die nach den oben genannten Kriterien als potentielle RIM2-Interaktionspartner eingestuft wurden. Dabei handelte es sich neben diversen Varianten des Motorproteins Myosin (Tabelle 6.2, # 2, 4, 5, 10, 12, 14, 15, 20, 21) (Papadopoulos, Tomatis et al. 2013) vor allem um Zytoskelett- oder daran assoziierte Proteine wie Plectin, Vimentin, Afadin, Gelsolin, Spectrin- α , *Myosin phosphatase Rho-interacting protein*, Desmin oder die *MAP/microtubule affinity-regulating kinase* (Tabelle 6.2, # 1, 6, 7, 8, 13, 18, 19, 24) (Stossel, Chaponnier et al. 1985; Drewes, Ebner et al. 1997; Surks, Richards et al. 2003; Bar, Strelkov et al. 2004; Baines 2009; Castanon, Walko et al. 2013; Matsuyama, Tanaka et al. 2013; Monteiro, Sumagin et al. 2013).

Neben diesen Filament-assoziierten Proteinen fällt noch eine weitere Gruppe von Proteinen auf, die aufgrund ihrer Funktion in vesikulären Transportprozessen in einer Kategorie zusammengefasst werden können. Zu dieser Gruppe gehören das in Endozytoseprozesse involvierte Clathrin (Pearse 1976; McMahon und Boucrot 2011), das Munc18-ähnliche *Syntaxin-binding protein 1-like 2* (Dascher und Balch 1996) sowie der Rab5-Effektor *Rab GTPase-binding effector protein 2* (Gournier, Stenmark et al. 1998) und die Untereinheiten des *Rab3 GTPase-activating protein* (Tabelle 6.2, # 9, 22, 25, 26, 27) (Fukui, Sasaki et al. 1997). Von besonderem Interesse sind in dieser Gruppe die Peptide des ubMunc13-2-Proteins (Tabelle 6.2, # 16). Sie belegen die testikuläre Expression speziell dieser Munc13-Variante (Abbildung 6.8) sowie deren endogene Interaktion mit RIM2. Außerdem wurde ein weiterer neuronaler Interaktionspartner von RIM, der ebenfalls dem Netzwerk der CAZ angehört (Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002) zum ersten Mal im Hodengewebe und darüber hinaus sogar als testikulärer Bindungspartner von RIM2 nachgewiesen – das ELKS/ERC2-Protein (Tabelle 6.2, # 23). Als potentielle Interaktionspartner von RIM2 im männlichen Reproduktionssystem kommen also sowohl Zytoskelettkomponenten als auch in Membranfusion- und fission involvierte Proteine in Betracht.

Tabelle 6.2: Massenspektrometrische Identifikation von Immunpräzipitaten aus Rattenhoden.

#	Identifizierte Proteine	Anzahl identifizierter Peptide	
		1. IP	2. IP
1	Plectin	379	397
2	Myosin-9	183	152
3	<i>Rab3-interacting molecule 2 (RIM2)</i>	144	142
4	Myosin-10	139	118
5	Myosin-11	143	103
6	Vimentin	71	87
7	Afadin	60	95
8	Gelsolin	45	28
9	Clathrin	29	30
10	unkonventionelles Myosin-Ib	31	11
11	6-Phosphofructo-2-Kinase	15	26
12	unkonventionelles Myosin-Ic	30	10
13	Spectrin- α	12	23
14	unkonventionelles Myosin-Id	20	11
15	unkonventionelles Myosin-Vb	15	15
16	Unc-13 Homolog B (ubMunc13-2)	8	17
17	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A)</i>	9	14
18	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	12	7
19	Desmin	3	7
20	Myosin, leichte Kette 6	5	4
21	Tropomyosin α -3	7	2
22	<i>Sec1 (Munc18) family domain-containing protein 1 / Syntaxin-binding protein 1-like 2</i>	1	6
23	ELKS/ERC2	2	4
24	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2)</i>	1	5
25	<i>Rab GTPase-binding effector protein 2</i>	1	4
26	<i>Rab3 GTPase-activating protein</i> , katalytische Untereinheit	2	2
27	<i>Rab3 GTPase-activating protein</i> , nicht-katalytische Untereinheit	1	2
28	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII δ)	2	-

Zur Identifikation von neuen Bindungspartnern des testikulären RIM2-Proteins wurden massenspektrometrische Analysen von zwei tryptisch verdauten RIM2-Immunpräzipitationen aus Rattenhodenlysat durchgeführt [1. IP, 2. IP]. Die Proteine sind in absteigender Häufigkeit identifizierter Peptide aufgelistet. Ein mindestens fünffacher Überschuss von Peptiden eines Proteins in der RIM2-Immunpräzipitation gegenüber der Kontrolle oder ein Minimum von zwei Peptiden sofern die Kontrolle keine enthielt, wurde als Co-Präzipitat von RIM2 betrachtet (s. auch Abschnitt 5.2.5.4).

Des Weiteren wurden einige Enzyme mit RIM2 co-präzipitiert, deren funktionelle Rolle in Bezug auf die bisher beschriebenen Funktionen von RIM2 bei der neuronalen und akrosomalen Exozytose nicht auf den ersten Blick ersichtlich ist. Dazu gehören metabolische Enzyme wie die 6-Phosphofructo-2-Kinase (El-Maghrabi, Fox et al. 1982) genauso wie solche, die diverse Funktionen während der neuronalen Entwicklung

einnehmen, z. B. die *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A* (DYRK1A) (Tabelle 6.2, # 11, 17) (Thomazeau, Lassalle et al. 2014). Bemerkenswert ist, dass in DYRK1A überexprimierenden Mäusen ein verringertes Verhältnis der aktiven, phosphorylierten Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMK) zu nicht-phosphorylierter, inaktiver CaMK beobachtet wurde (Thomazeau, Lassalle et al. 2014). Dies ist von besonderem Interesse, da die phosphorylierte Form der CaMKII α bei der Verhinderung der spontanen akrosomalen Exozytose eine wichtige funktionelle Rolle einnimmt (s. Abschnitt 6.4; Ackermann, Zittronski et al. 2009). Die δ -Isoform der CaMKII, die auch in Präparationen von synaptischen Spezialisierungen zu finden ist (Li, Hornshaw et al. 2004), konnte außerdem in einer der beiden RIM2-Immunpräzipitationen identifiziert werden (Tabelle 6.2, # 28).

6.4 Zusammenspiel von CaMKII und MUPP1 in Spermien

6.4.1 Funktion der CaMKII bei der Akrosomreaktion

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass der CaMKII-Aktivator Calmodulin (Chin und Means 2000; Hook und Means 2001; Hudmon und Schulman 2002) sowohl allein (Dissertation Frauke Ackermann, 2008) als auch im Komplex mit dem namensgebenden Interaktionspartner von RIM-Proteinen, dem Rab3A-Protein, die Akrosomreaktion regulieren kann (Yunes, Tomes et al. 2002). Da in einer der RIM2 α -Immunpräzipitationen eine CaMKII mit endogenem testikulären RIM2 co-präzipitiert wurde (Tabelle 6.2), wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit die funktionelle Rolle der CaMKII als Effektor des Rab3A-Interaktionspartners und Calcium-Sensorproteins Calmodulin während der Akrosomreaktion in Spermien untersucht. Vorangehende Studien haben bereits gezeigt, dass die α -Isoform der CaMKII in Spermien verschiedener Säugerspezies im Bereich des Akrosoms lokalisiert ist (Dissertation Frauke Ackermann, 2008). Außerdem führt eine Inhibition von Calmodulin durch den Calmodulin-Antagonisten W7 (Hidaka, Asano et al. 1981) konzentrationsabhängig sowohl zur einer Erhöhung der spontanen als auch der Calcium-induzierten Akrosomreaktionsrate von Mausspermien (Dissertation Frauke Ackermann, 2008).

6.4.1.1 Inhibition der spontanen Akrosomreaktion durch die CaMKII

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Calmodulin in Spermien (Yunes, Tomes et al. 2002; Tulsiani, Zeng et al. 2007; Gonzalez-Fernandez, Macias-Garcia et al. 2012; Rotfeld, Hillman et al. 2014) reicht die Beobachtung, dass die Inhibition des CaMKII-Aktivators Calmodulin Auswirkungen auf die akrosomale Exozytose hat (Yunes, Tomes et al. 2002; Tulsiani, Zeng et al. 2007), nicht aus, um auf eine direkte Beteiligung der CaMKII an der akrosomalen Exozytose zu schließen. Daher wurde zum einen geprüft, ob eine direkte Inhibition der CaMKII die Akrosomreaktion beeinflusst. Zum anderen wurde analysiert, ob die CaMKII in Spermien möglicherweise in Analogie zu Neuronen auch als Komplex mit MUPP1 vorliegt (Krapivinsky, Medina et al. 2004) und welche Bedeutung eine solche Interaktion für die Akrosomreaktion haben könnte. Die dabei gewonnenen Befunde sind zum überwiegenden Teil in der Publikation „CaMKIIalpha interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis“ (Ackermann, Zitanski et al., Journal of Cell Science, 2009) beschrieben.

In den initialen Studien wurden *in vitro* kapazitierte epididymale Mausspermien mit verschiedenen Konzentrationen des CaMKII-Inhibitors *Autocamtide-2 inhibitory*

peptide II (AIIPII) vorinkubiert, der die katalytische Domäne der Kinase direkt inhibiert (zur Übersicht über den Aktivierungsmechanismus der CaMKII s. Abbildung 6.28). Dabei wurde ein Fusionspeptid des AIIPII verwendet, bei dem der Inhibitor an das *Antennapedia*-Transportpeptid gekoppelt ist (Watterson, Mirzoeva et al. 2001). Dies ermöglicht eine Translokation von AIIPII über die intakte Zellmembran (Derossi, Joliot et al. 1994) und eine vorherige Permeabilisierung der Spermien mit SLO (s. Abschnitt 6.1.2) ist nicht notwendig.

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von AIIPII für aus Rattencortex affinitätsgereinigte CaMKII beträgt 4,1 nM und wurde mit Hilfe eines Zell-freien experimentellen Ansatzes ermittelt (Ishida, Shigeri et al. 1998). Jedoch ist die tatsächliche, effektive Konzentration des Inhibitors nach einer Membranpassage ins Zytosol von vielen Faktoren abhängig (Jones und Sayers 2012). Z. B. beeinflussen die extrazelluläre Konzentration des Inhibitor-Fusionspeptids (Derossi, Joliot et al. 1994) genauso wie die an das Transportpeptid gekoppelte „Fracht“ selbst und die Eigenschaften des zu analysierenden zellulären Modellsystems die Aufnahme der Substanz in die Zelle (Jones und Sayers 2012). Vor allem aber kann die Anwesenheit von Serumalbumin, wie es im Kapazitationsmedium der Spermien (s. 4.2) notwendigerweise enthalten ist (de Lamirande, Leclerc et al. 1997; Fleisch, Brouwers et al. 2001), die Translokation des *Antennapedia*-Peptids und des damit fusionierten Inhibitors signifikant reduzieren (Jones und Sayers 2012). Daher wurde für die Analyse der Spermien ein Konzentrationsspektrum von 1 μ M bis 50 μ M des Transportpeptid-fusionierten Inhibitors eingesetzt, wie es auch für andere Applikationen beschrieben ist (Jones und Sayers 2012).

Zur Bestimmung der Effekte der CaMKII-Inhibition sowohl auf die Calcium-induzierte als auch auf die spontane Akrosomreaktionsrate wurden die Spermien im Anschluss an die Inhibitor-Vorinkubation (s. Abschnitt 5.3.4) entweder mit dem Calcium-Ionophor A23187 oder der gleichen Verdünnung des verwendeten Lösungsmittels DMSO behandelt. Da die Isolierung und *in vitro* Kapazitation der Spermien bereits *per se* zu einer erhöhten spontanen Akrosomreaktionsrate führt (Bedford 1970; Klemm und Engel 1991; s. auch Abschnitt 6.1.2), wurde zudem die basale Akrosomreaktionsrate von Spermien ohne AIIPII-Vorbehandlung und ohne A23187-Stimulation bestimmt. Die basale Exozytoserate dieser Negativkontrolle betrug bei dieser Versuchsreihe im Mittel $30,91 \pm 2,66 \%$ (Abbildung 6.27, [spontan, 0 μ M AIIPII]). Um die Steigerung der Akrosomreaktionsrate durch die Ionophor-bedingte Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration der Spermien zu überprüfen (Brucker und Lipford 1995; Liu und Baker 1996; Kirkman-Brown, Punt et al. 2002), wurde außerdem eine Spermienprobe als Positivkontrolle ohne Inhibitor-Vorbehandlung mit A23187 inkubiert. Durch die Zugabe des Ionophors stieg der Prozentsatz Akrosom-reagierter Spermien auf das 2,6-fache der Negativkontrolle (Abbildung 6.27, [A23187, 0 μ M AIIPII]: $80,81 \pm 2,70 \%$).

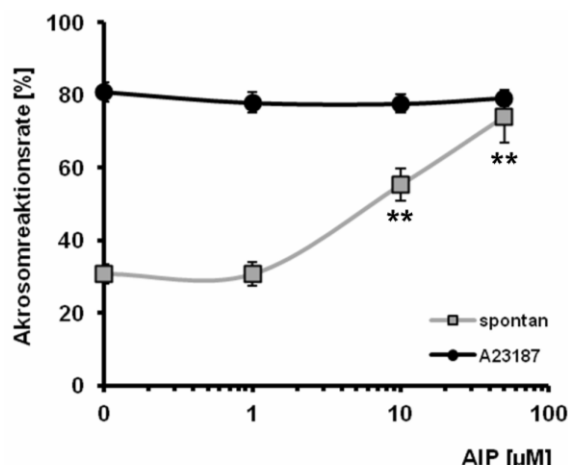


Abbildung 6.27: Inhibition der CaMKII α und Analyse der spontanen und Calcium-induzierten Akrosomreaktion in Mausspermien.

Die funktionelle Rolle der CaMKII während der Akrosomreaktion wurde mit Hilfe des Membran-permeablen Inhibitors *Autocamtide-2 inhibitory peptide II* [AIPII] untersucht. Dafür wurden *in vitro* kapazitierte Balb/C Spermien einem breiten Konzentrationsspektrum des Inhibitors vorinkubiert. Anschließend wurde entweder die Akrosomreaktion mit Hilfe des Calcium-Ionophors A23187 induziert [A23187] und so der Effekt des Inhibitors auf die Calcium-induzierte Akrosomreaktionsrate bestimmt oder es wurde eine identische Verdünnung des verwendeten Lösungsmittels zugegeben (0,1 % DMSO) und die spontane Akrosomreaktionsrate [spontan] quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass keine der verwendeten Konzentrationen des Inhibitors einen Einfluss auf die Calcium-stimulierte Akrosomreaktionsrate hatte [A23187], während der Anteil spontan Akrosom-reagierter Spermien nach Inhibition der CaMKII mit 10 µM bzw. 50 µM des Inhibitors im Vergleich zur Inhibitor-freien Kontrolle [0 µM] signifikant erhöht war [spontan]. Die Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsraten \pm SEM von 7 unabhängigen Spermienpräparationen. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt und sind mit **: $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Betrachtet man im Vergleich dazu die Akrosomreaktionsraten der mit 1 µM, 10 µM und 50 µM AIPII vorinkubierten Spermien nach A23187-Stimulation, zeigten sich keine Inhibitor-bedingten Auswirkungen auf die Calcium-induzierte Akrosomreaktion. Die Exozytoseraten dieser Proben zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle (Abbildung 6.27, [A23187, 1 µM, 10 µM und 50 µM AIPII]). Die Inhibitionen von Calmodulin und CaMKII haben also divergierende Effekte auf die Calcium-vermittelte Akrosomreaktion. Dies weist darauf hin, dass Calcium/Calmodulin vielfältige, teilweise von der CaMKII unabhängige Funktionen in Spermienzellen ausübt (Yunes, Tomes et al. 2002; Tulsiani, Zeng et al. 2007; Gonzalez-Fernandez, Macias-Garcia et al. 2012; Rotfeld, Hillman et al. 2014).

Die Quantifizierung der spontanen akrosomalen Exozytoserate nach Inkubation der Spermien mit 1 µM AIPII führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Akrosomreaktionsrate im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 6.27, [spontan], 1 µM AIPII). Wurden die Spermien jedoch mit höheren Konzentrationen des CaMKII-Inhibitors vorinkubiert, war ein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes Akrosom-reagierter Spermien verglichen mit der basalen Akrosomreaktionsrate der Negativkontrolle zu verzeichnen. Im Mittel betrug er nach Vorinkubation der Spermien mit 10 µM AIPII $55,35 \pm 4,46$ % und mit 50 µM AIPII sogar $74,09 \pm 7,29$ % (Abbildung 6.27, [spontan], 10 µM bzw. 50 µM AIPII). Die Steigerung der spontanen Akrosomreaktionsrate durch den CaMKII-Inhibitor zeigte also eine deutliche

Konzentrationsabhängigkeit. Auffällig ist außerdem, dass im Gegensatz zur Calmodulin-Inhibition (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Ackermann, Zitanski et al. 2009), die Wirkung der direkten CaMKII-Inhibition auf spontane Exozytoseprozesse beschränkt war. Die Erhöhung der spontanen Akrosomreaktionsrate durch die Inhibition der CaMKII weist darauf hin, dass die Aktivität der CaMKII eine Reduktion der spontanen Exozytose zur Folge hat und damit an der Prävention spontan auftretender Akrosomreaktionsereignisse in Mausspermien beteiligt sein könnte.

6.4.1.2 Bestimmung des Aktivierungszustands der CaMKII in epididymalen Nagerspermien

Die Kapazitation von Spermien ist ein sekundärer Reifungsprozess, der *in vivo* im weiblichen Genitaltrakt abläuft (Austin 1952) und die physiologischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Akrosomreaktion schafft (Flesch, Brouwers et al. 2001; Jha, Kameshwari et al. 2003; Kirichok, Navarro et al. 2006; Salicioni, Platt et al. 2007). Unter der Bezeichnung Kapazitation werden eine Vielzahl von Einzelreaktionen zusammengefasst (s. auch Abschnitt 3.1.3): Neben der Phosphorylierung einzelner Komponenten der an der Akrosomreaktion beteiligten Signaltransduktionskaskade/n (s. Abschnitt 3.1.4) kommt es u. a. auch zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration (Breitbart 2003). Da ein Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels auch eine Voraussetzung für die Aktivierung der CaMKII ist (Hunter und Schulman 2005; Abbildung 6.28), stellte sich die Frage, ob die Kapazitation den Anteil an aktiver, phosphorylierter CaMKII α (p-CaMKII α) (Hudmon und Schulman 2002) in Spermien beeinflussen kann.

Da die CaMKII einer Autoregulation durch Phosphorylierung verschiedener Threoninreste unterliegt und daher ihren Aktivierungszustand selbst beeinflussen kann (Griffith 2004), soll der komplizierte Aktivierungsmechanismus des CaMKII-Holoenzym anhand der schematischen Darstellung in Abbildung 6.28 kurz erläutert werden. Im inaktiven Zustand blockiert der autoinhibitorische Teil der regulatorischen Domäne die katalytische Domäne der jeweiligen Untereinheit (Hudmon und Schulman 2002). Durch den Einstrom von Calcium-Ionen ins Zytoplasma einer Zelle kommt es zur Bindung von Calcium/Calmodulin (Chin und Means 2000) an die regulatorische Domäne der CaMKII-Untereinheiten (Hook und Means 2001) und damit zur Aufhebung der Autoinhibition, sodass die Kinase aktiviert wird (Hudmon und Schulman 2002). Ist die Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration ausreichend hoch und/oder langanhaltend, kommt es zur Bindung von Calcium/Calmodulin an mindestens zwei benachbarte Untereinheiten des Holoenzym (Griffith 2004). Das führt dazu, dass die katalytische Domäne einer Untereinheit das Threonin 286 der angrenzenden Untereinheit phosphoryliert (p-T286) (Griffith 2004). In Folge dessen bleibt die CaMKII auch nach der Dissoziation von Calcium/Calmodulin in einem

autonom aktiven Zustand (Hanson und Schulman 1992) und weitere Threoninreste (T305 und T306), die zuvor durch Calcium/Calmodulin maskiert wurden (Meador, Means et al. 1993), werden autophosphoryliert (Hudmon und Schulman 2002; Griffith 2004). Durch diese Autophosphorylierung von T305 und T306 ist im Gegenzug die Assoziation von Calcium/Calmodulin an die Kinase unterbunden (Hanson und Schulman 1992). Folglich befindet sich die CaMKII in einem autonom aktiven Zustand, indem sie nicht mehr durch Calcium/Calmodulin beeinflusst wird, ihre Substrate aber weiterhin phosphorylieren kann (Hudmon und Schulman 2002; Griffith 2004). Erst die Dephosphorylierung von p-T286, p-T305 und p-T306 durch Phosphatasen kann die CaMKII in den inaktiven, *Calcium/Calmodulin-responsiven* Zustand zurückversetzen (Yoshimura, Sogawa et al. 1999; Colbran 2004). Die Phosphorylierung an T286 ist also ein Maß für die autonome Aktivierung der CaMKII (Hanson und Schulman 1992), weswegen im Folgenden ein Antikörper eingesetzt wird, der spezifisch die an T286 phosphorylierte Form der CaMKII α (p-CaMKII α) erkennt.

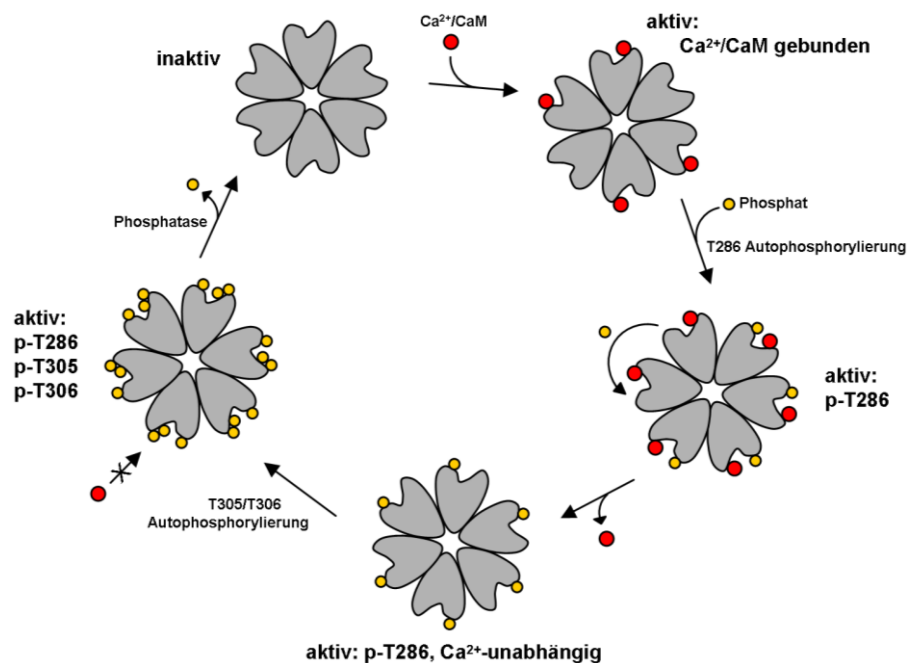


Abbildung 6.28: Modell zur Aktivierung der CaMKII.

In Abwesenheit von Calcium/Calmodulin [$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$] befindet sich das aus mehreren identischen Untereinheiten bestehende CaMKII-Holoenzym in einem inaktiven Zustand. Nach einer Erhöhung der zyttoplasmatischen Calcium-Konzentration bindet $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an die regulatorische Domäne der CaMKII, wodurch die Autoinhibition aufgehoben wird und die Kinase ihre Substrate phosphorylieren kann [aktiv: $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ gebunden]. Sind an zwei benachbarte Untereinheiten $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Moleküle gebunden, kommt es zur Autophosphorylierung der angrenzenden Untereinheit an Threonin 286 [aktiv: p-T286]. Dadurch bleibt die Kinase selbst nach der Dissoziation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ in einem aktivierten Zustand [aktiv: p-T286, Ca^{2+} -unabhängig]. Durch die Dissoziation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ werden zusätzlich noch zwei weitere Phosphorylierungsstellen an den Threoninen 305 und 306 frei, die dann ebenfalls autophosphoryliert werden [aktiv: p-T286, p-T305, p-T306], wodurch eine erneute Bindung von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ verhindert wird und die CaMKII im autonom aktiven Zustand verbleibt. Zur Rückkehr in den inaktiven, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -reaktiven Zustand müssen gebundene Phosphatreste durch Phosphatasen wieder abgespalten werden. Abbildung in Anlehnung an (Griffith 2004).

Zunächst sollte überprüft werden, in welchem Phosphorylierungszustand sich die CaMKII α in frisch isolierten, nicht kapazitierten Spermien befindet. Hierzu wurden Zellkern-freie Homogenate epididymaler Rattenspermien im Immunoblot mit Hilfe des anti-p-CaMKII α spezifischen Antikörpers analysiert, der das an Threonin 286 phosphorylierte Enzym detektiert (Zoladz, Park et al. 2012). Auffällig war dabei, dass epididymale Rattenspermien auch ohne Kapazitation bereits eine p-CaMKII α -immunreaktive Bande aufwiesen (Abbildung 6.29A, [HS-Puffer], linke Spur), die dem Molekulargewicht der CaMKII α entspricht (52 kDa; Griffith 2004). Um abschätzen zu können, wie hoch der Anteil an p-T286-CaMKII α war, wurde der maximale Grad der Phosphorylierung der CaMKII bestimmt, indem die Spermienproben direkt mit exogenem Calcium/Calmodulin inkubiert wurden. Dafür wurden zu einer Hälfte des jeweiligen Spermienlysats 1,2 μ M rekombinantes Calmodulin, 2 mM CaCl₂ und 100 μ M ATP gegeben (Yang und Schulman 1999) und die p-CaMKII α -Immunreaktivität dieser Hälfte mit der der unbehandelten epididymalen Spermien verglichen. Um zunächst die Beladung des Immunoblots zu überprüfen, wurde der untere Teil des Nitrozellulosebogens, auf den die Proteine transferiert wurden, abgetrennt und mit Hilfe eines Antikörpers entwickelt, der das Caveolin-1-Protein detektiert. Dabei war in allen Spuren ein ähnlich starkes Caveolin-1-Immunsignal zu beobachten (Abbildung 6.29A, [HS-Puffer], untere Teilabbildung). Dies bestätigt eine vergleichbare Beladung der Spuren beider Hälften des Lysats. Betrachtet man die p-CaMKII α -Immunreaktivität der beiden Proben, wird deutlich, dass die Stimulation mit Calcium/Calmodulin zu keiner stärkeren p-CaMKII α -Immunmarkierung führte (Abbildung 6.29A, [HS-Puffer], rechte Spur). Dies suggeriert, dass sich ein Großteil der CaMKII α in den frisch isolierten Spermien bereits im aktiven, maximal phosphorylierten Zustand des T286 befindet.

Ob die während der Kapazitation der Spermien ablaufenden Prozesse dennoch zu Veränderungen des Anteils phosphorylierter CaMKII α führen können, wurde in weiteren Immunoblots mit Lysaten von Rattenspermien analysiert, die in Kapazitationspuffer isoliert wurden. Ein Teil der Spermien wurde dabei zur *in vitro* Kapazitation 90 Minuten inkubiert, während der andere Teil zur Kontrolle der basalen CaMKII α -Phosphorylierung direkt nach der Isolierung homogenisiert wurde. Um außerdem zu evaluieren, ob die Zugabe von Calcium/Calmodulin zu einer Veränderung der p-CaMKII α -Immunreaktivität führt, wurde auch hier je eine Hälfte des Homogenats mit rekombinantem Calcium/Calmodulin (s. o.) versetzt. Die mit einem anti-Caveolin-1 Antikörper entwickelte Kontrolle bestätigte erneut eine vergleichbare Beladung der Spuren des Immunoblots (Abbildung 6.29A, [Kapazitationspuffer], untere Teilabbildung). Interessanterweise veränderte sich der Anteil phosphorylierter CaMKII α weder durch die 90-minütige *in vitro* Kapazitation noch durch die Zugabe von exogenem Calcium/Calmodulin (Abbildung 6.29A, [Kapazitationspuffer]). Zur Überprüfung, ob die Kapazitation der Spermien oder die Zugabe von rekombinantem Calcium/Calmodulin möglicherweise die Gesamtmenge vorhandener CaMKII α

beeinflusst, wurden außerdem Immunoblots derselben Homogenate mit einem anti-CaMKII α Antikörper entwickelt, der die Kinase unabhängig von ihrem Aktivitätszustand detektiert (Hudmon und Schulman 2002). Dabei wurden keine Unterschiede in der vorhandenen CaMKII α -Immunreaktivität beobachtet (Abbildung 6.29B). Die CaMKII α ist in Rattenspermien also initial, Kapazitations-unabhängig bereits in einem an T286 phosphorylierten und damit aktiven Zustand.

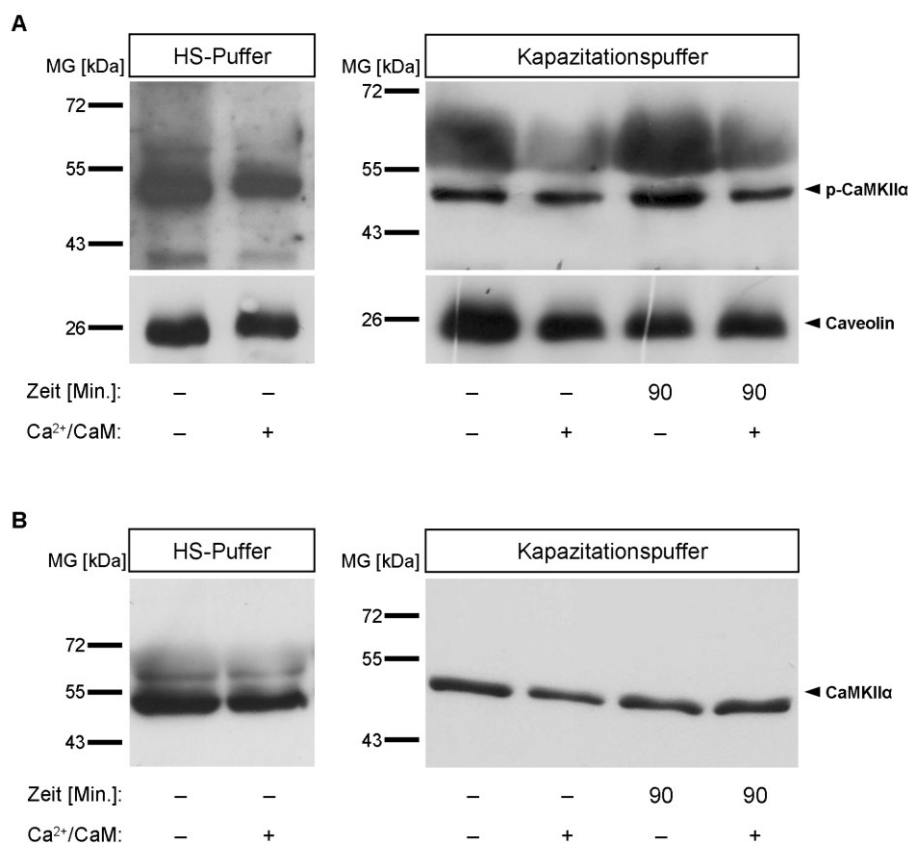


Abbildung 6.29: Phosphorylierungszustand der CaMKII α in isolierten Rattenspermien.

[A] Um festzustellen, ob sich der Aktivitätszustand der CaMKII α während der Kapazitation verändert, wurden Zellkern-freie Homogenate (S₀) aus frisch isolierten und aus 90 Minuten *in vitro* kapazitierten Rattenspermien hergestellt und im Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers analysiert, der die aktive, an T286 phosphorylierte Form der CaMKII α erkennt [p-CaMKII α]. Unkapazitierte, in HS-Puffer isolierte Spermien wiesen dabei bereits phosphorylierte CaMKII α auf ([HS-Puffer], linke Spur). Daher wurde der maximale Grad der Phosphorylierung der CaMKII nach Zugabe von rekombinantem Calcium/Calmodulin [Ca²⁺/CaM] (1,2 μ M Calmodulin, 2 mM CaCl₂, 100 μ M ATP) zu dem Homogenat nicht kapazitierte Spermien überprüft, woraus jedoch keine Erhöhung des Anteils phosphorylierter CaMKII α resultierte ([HS-Puffer], rechte Spur). Weder die 90-minütige *in vitro* Kapazitation [Kapazitationspuffer, 90 Min.], noch die Zugabe von exogenem Ca²⁺/CaM zu den kapazitierten Spermien ([Kapazitationspuffer, 90 Min.], rechte Spur) führte zu einer Erhöhung des Anteils phosphorylierter CaMKII α im Vergleich zu Spermien, die direkt nach der Isolierung in Kapazitationspuffer lysiert wurden [Kapazitationspuffer, - Min.]. Die diffuse Immunreaktivität bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa resultiert aus der Anwesenheit von BSA im Kapazitationspuffer. Um sicherzustellen, dass die SDS-PAGE-Gele mit gleichen Proteinmengen der Homogenate beladen wurden, wurde der untere Teil der Nitrozellulosebögen abgetrennt und mit einem anti-Caveolin-1 Antikörper entwickelt (untere Teilabbildungen). Diese Ladekontrolle zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben in Bezug auf die Caveolin-1-Immunreaktivität.

[B] Um zu überprüfen, ob sich die Gesamtmenge der CaMKII α durch die Zugabe von rekombinantem Ca²⁺/CaM (1,2 μ M Calmodulin, 2 mM CaCl₂, 100 μ M ATP) oder durch die *in vitro* Kapazitation verändert, wurden dieselben Homogenate in einem zusätzlichen Immunoblot mit Hilfe eines Antikörpers analysiert, der die CaMKII α unabhängig von ihrem Aktivierungszustand detektiert. Die Spermienpräparationen zeigten nach den verschiedenen Behandlungen jedoch keine Unterschiede in der Gesamtmenge der vorhandenen CaMKII α . Das Molekulargewicht [MG] in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Größe der genannten Proteine an. Die gezeigten Immunoblots sind repräsentative Abbildungen von mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen.

Um die Befunde der Rattenspermien zu verifizieren, wurden auch murine epididymale Spermien auf den Phosphorylierungszustand der CaMKII α hin überprüft. Diese Analysen zeigten, dass auch frisch isolierte Mausspermien initial bereits p-CaMKII α -Immunreaktivität besitzen, die sich nicht durch die Kapazitation oder Behandlung mit Calcium/Calmodulin steigern ließ (nicht gezeigt). Der Aktivierungszustand der CaMKII α in epididymalen Nagerspermien ist demnach nicht durch Zugabe von Calcium/Calmodulin beeinflussbar, was auf einen autonom aktiven Zustand der Kinase schon vor der Kapazitation schließen lässt.

6.4.2 Funktionelle Bedeutung eines CaMKII-MUPP1-Komplexes für die spontane Akrosomreaktion

6.4.2.1 Interaktion von CaMKII und MUPP1

Da die CaMKII α in epididymalen Spermien bereits in einem aktiven Zustand vorliegt (Abbildung 6.29) und eine Inhibition der katalytischen CaMKII α -Aktivität die spontane Akrosomreaktionsrate erhöht (Abbildung 6.27), stellte sich als nächstes die Frage, wie die spontan ablaufenden Exozytoseereignisse von der Enzymaktivität der CaMKII α beeinflusst werden. Um diese Frage zu klären, ist es wichtig zu prüfen, welche Zielstrukturen die CaMKII in Spermien phosphoryliert. Von hippocampalen Synapsen ist bekannt, dass das Gerüstprotein MUPP1 die CaMKII in räumliche Nähe zu dem CaMKII-Substrat SynGAP (synaptisches GTPase aktivierendes Protein) bringt, sodass dieses phosphoryliert werden kann (Krapivinsky, Medina et al. 2004). Da MUPP1 nicht nur im Gehirn, sondern auch in Säugerspermien exprimiert wird (Heydecke, Meyer et al. 2006), wo es an der Regulation der akrosomalen Exozytose beteiligt ist (Ackermann, Zitanski et al. 2008), wurde in vorangehenden *in vitro* Interaktionsstudien geprüft, ob die testikuläre CaMKII auch an MUPP1 binden kann. Dies konnte in Bindungsstudien mit MUPP1-GST-Fusionsproteinen und Hodenlysate bestätigt werden, in denen die Bindung von testikulärer CaMKII α an die PDZ-Domänen 10 und/oder 11 der insgesamt 13 PDZ-Domänen von MUPP1 (Ullmer, Schmuck et al. 1998) beobachtet wurde (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Ackermann, Zitanski et al. 2009). Obwohl sich die CaMKII-bindenden Domänen des testikulären MUPP1-Proteins von den MUPP1-Domänen unterscheiden, die die CaMKII-MUPP1-Interaktion in Neuronen vermitteln (Krapivinsky, Medina et al. 2004), ist der CaMKII α -MUPP1-Komplex in beiden Fällen Calcium/Calmodulin-sensitiv. Das heißt die Zugabe von exogenem Calcium/Calmodulin führt zur Dissoziation der CaMKII α von MUPP1 (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Krapivinsky, Medina et al. 2004).

Um zunächst die in Hodenlysaten beobachtete Bindung der CaMKII an MUPP1 in Spermien zu verifizieren, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit MUPP1-GST-Fusionsproteinen und zytoplasmatischen Rattenspermienfraktionen (s. Abschnitt

5.2.1.1) durchgeführt. Die dabei verwendeten MUPP1-Konstrukte beinhalten mit GST fusionierte, überlappende Aminosäuresequenzen von je zwei bis vier der 13 PDZ-Domänen des MUPP1-Proteins, dessen Struktur in Abbildung 6.30A schematisch dargestellt ist. Die potentiell aus Spermien- und MUPP1-GST-Fusionsprotein gebildeten Komplexe wurden affinitätsgereinigt und anschließend im Immunoblot mit Hilfe des anti-CaMKII α Antikörpers analysiert, der die Kinase unabhängig von ihrem Aktivitätszustand detektiert.

Zu Sicherstellung, dass gleiche GST-Proteinmengen der affinitätsgereinigten Komplexe im Immunoblot analysiert wurden, wurde der Nitrozellulosebogen zum einen mit Ponceau S gefärbt. Zum anderen wurde die gleichmäßige Beladung der verschiedenen Ansätze mit Hilfe eines Antikörpers überprüft, der das GST-Tag der Fusionsproteine detektiert. In beiden Ladekontrollen wurden gleiche Mengen der eingesetzten MUPP1-GST-Fusionsproteine in den zu analysierenden Ansätzen nachgewiesen (nicht gezeigt).

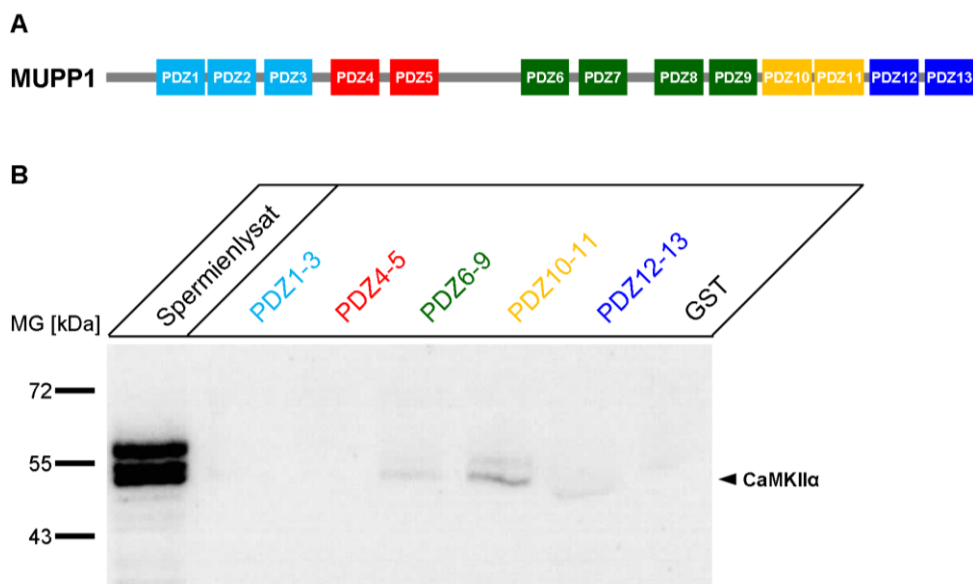


Abbildung 6.30: *In vitro* Bindungsstudien von MUPP1 und CaMKII α aus isolierten Spermien.

[A] Die schematische Darstellung der strukturellen Domänen des MUPP1-Proteins zeigt seine 13 PDZ-Domänen, die vom N- zum C-Terminus fortlaufend nummeriert sind. Die Domänen, die in den in [B] eingesetzten GST-Fusionsproteinen zusammengefasst sind, sind in gleicher Farbe markiert. Das Polypeptidrückgrat ist als grauer Balken dargestellt. Modifiziert nach (Ullmer, Schmuck et al. 1998).

[B] Mit Hilfe eines *in vitro* Bindungsassays wurde eine potentielle Bindung von Spermien-CaMKII α an das MUPP1-Protein überprüft. Dafür wurden in Bakterien überexprimierte MUPP1-GST-Fusionsproteine, die alle PDZ-Domänen des MUPP1-Proteins überlappend abdecken, mit Zytoplasmafraktionen (s. Abschnitt 5.2.1.1) aus Rattenspermien inkubiert. Nach der Affinitätsreinigung potentieller Proteinkomplexe wurden sie im Immunoblot auf die Anwesenheit der CaMKII α hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Bande, die dem Molekulargewicht der CaMKII α im Spermienlysat entspricht [Spermienlysat], hauptsächlich in den Spuren des Fusionsproteins zu beobachten war, das die PDZ-Domänen 10 und 11 des MUPP1-Proteins umfasst [PDZ10-11]. Eine gleichmäßige Beladung der verschiedenen Ansätze mit den MUPP1-GST-Fusionsprotein-Komplexen wurde durch eine Färbung mit Ponceau S und eine nach dem Entfernen des anti-CaMKII α Antikörpers (s. Abschnitt 5.2.4) erfolgte Detektion der GST-Fusionsproteine mit Hilfe eines Antikörpers, der das GST-Tag der Fusionsproteine erkennt, verifiziert (nicht gezeigt). Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; der Pfeil auf der rechten Seite deutet die molekulare Masse der CaMKII α an. Der gezeigte Immunoblot ist eine repräsentative Abbildung von mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Spermienpräparationen. GST: nicht fusionierte Glutathion S-Transferase.

Außerdem wurde parallel zu den MUPP1-Proteinkomplexen das verwendete Spermienlysate im Immunoblot analysiert, was eine exakte Zuordnung potentieller CaMKII α -immunreaktiver Banden in den Proteinkomplexen erlaubt. Dabei waren im Spermienlysate zwei immunreaktive Banden zu beobachten (Abbildung 6.30B, [Spermienlysate]), von denen die mit der kleineren molekularen Masse dem apparenten Molekulargewicht der CaMKII α entspricht (52 kDa; Griffith 2004). Vergleicht man die Präzipitate der MUPP1-GST-Fusionsproteine mit dem Spermienlysate, so war eine immunreaktive Bande desselben Molekulargewichts hauptsächlich in der Spur des Konstrukts zu beobachten, das die PDZ-Domänen 10 und 11 von MUPP1 umfasst (Abbildung 6.30B, [PDZ10-11]). Dagegen wiesen die Spuren der anderen GST-Proteine, die gleichzeitig Negativkontrollen für die Bindung der CaMKII an PDZ-Domänen im Allgemeinen darstellen, und die des nicht fusionierten GSTs kaum bis gar keine CaMKII α -Immunreaktivität auf (Abbildung 6.30B). Die CaMKII α des Spermienlysats interagiert also mit denselben MUPP1-Domänen wie die testikuläre CaMKII α (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Ackermann, Zitanski et al. 2009).

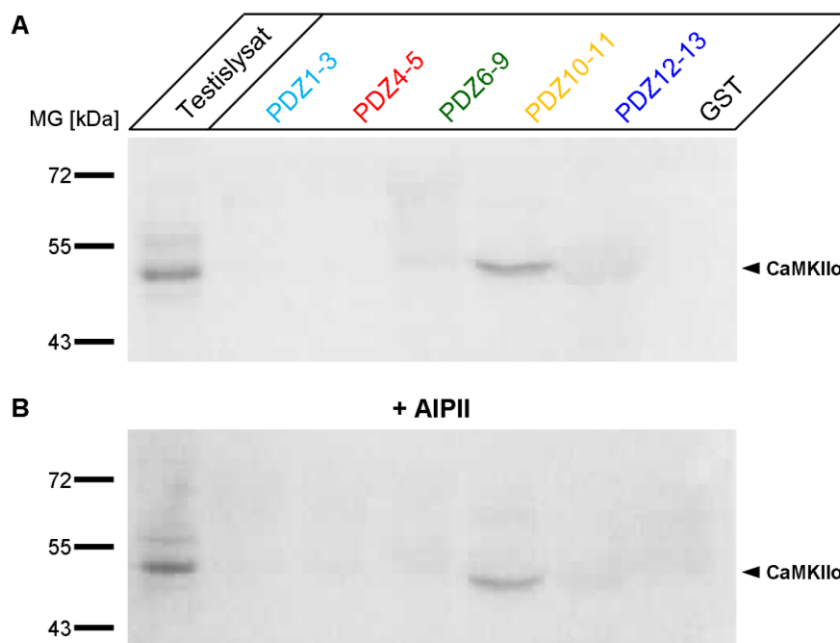


Abbildung 6.31: Untersuchung der Abhängigkeit der CaMKII-MUPP1-Interaktion von der Aktivität der Kinase im Hodenlysate.

Um zu prüfen, ob die beobachtete Bindung der CaMKII α an MUPP1 vom Aktivierungszustand der CaMKII abhängt, wurde eine Hälfte eines Rattenhodenlysats mit dem CaMKII-Inhibitor AIPII vorinkubiert, bevor parallele *in vitro* Bindungsstudien mit beiden Hälften des Hodenlysats durchgeführt wurden.

[A] Die Kontrolle mit unbehandelten Hoden-Zytoplasmafraktionen bestätigte die exklusive Bindung der testikulären CaMKII α [Testislysate] an das MUPP1-GST-Fusionsprotein, das die PDZ Domänen 10 und 11 von MUPP1 beinhaltet [PDZ10-11].

[B] Interessanterweise führte eine Vorinkubation des Hodenlysats mit 50 μ M des CaMKII-Inhibitors AIPII zu keiner Veränderung der CaMKII-MUPP1-Interaktion verglichen mit dem korrespondierenden AIPII-unbehandelten Hodenlysate [A].

Eine gleichmäßige Beladung der verschiedenen Ansätze mit den MUPP1-GST-Fusionsprotein-Komplexen wurde durch eine Färbung der Nitrozellulosebögen mit Ponceau S und eine nach dem Entfernen des anti-CaMKII α Antikörpers (s. Abschnitt 5.2.4) erfolgte Detektion der GST-Fusionsproteine mit Hilfe eines Antikörpers verifiziert, der das GST-Tag der Fusionsproteine erkennt (nicht gezeigt). Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Größe der CaMKII α an. Die gezeigten Immunoblots sind repräsentative Abbildungen von mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepreparationen. GST: nicht fusionierte Glutathion S-Transferase.

Um die funktionelle Bedeutung des CaMKII-MUPP1-Komplexes für die Akrosomreaktion in Spermien zu überprüfen, wurde außerdem analysiert, ob der Komplex neben der Sensitivität für Calcium/Calmodulin (Dissertation Frauke Ackermann, 2008) auch eine Abhängigkeit von der Enzymaktivität der CaMKII aufweist. Dafür wurden parallele Bindungsstudien mit den MUPP1-GST-Fusionsproteinen und Rattenhodenlysate durchgeführt, dessen eine Hälfte mit einer Konzentration des CaMKII-Inhibitors AIP2 vorinkubiert wurde (zur Übersicht über den Aktivierungsmechanismus der CaMKII s. Abbildung 6.28), die eine signifikante Erhöhung der spontanen Akrosomreaktionsrate von Mauspermien zur Folge hatte (50 μ M, Abbildung 6.27).

Auch hier zeigten die Kontrollen der Beladung des Nitrozellulosebogens in der Ponceau S-Färbung bzw. im Immunoblot mit Hilfe des anti-GST Antikörpers, dass gleiche Mengen der affinitätsgereinigten GST-Proteinkomplexe in allen Ansätzen vorhanden waren (nicht gezeigt). Im Immunoblot mit dem anti-CaMKII α Antikörper konnte im verwendeten Hodenlysate eine CaMKII α -immunreaktive Bande, die dem apparenten Molekulargewicht der Kinase entspricht (Griffith 2004), registriert werden (Abbildung 6.31A, [Testislysate]). Betrachtet man die Assoziation der CaMKII α an die verschiedenen Konstrukte der PDZ-Domänen von MUPP1, so konnte für die nicht mit dem Inhibitor behandelte Hälfte des Hodenlysats die exklusive Bindung von MUPP1 an die PDZ-Domänen 10 und/oder 11 bestätigt werden (Abbildung 6.31A, [PDZ10-11]). Wurde das Hodenlysate dagegen vor dem Bindungsassay mit 50 μ M AIP2 vorinkubiert und somit die Kinase inhibiert, zeigte sich interessanterweise eine unveränderte Verteilung der CaMKII α -Immunreaktivität (Abbildung 6.31B, [+ AIP2]). Im Vergleich zum parallelen Ansatz mit unbehandeltem Hodenlysate (Abbildung 6.31A) war für das mit AIP2 vorinkubierte Testislysate eine wiederum exklusive und außerdem gleich starke Bindung der CaMKII α an das MUPP1-GST-Fusionsprotein der PDZ-Domänen 10 und 11 von MUPP1 zu verzeichnen (Abbildung 6.31B, [PDZ10-11]).

Während exogenes Calcium/Calmodulin in der Lage ist, die Dissoziation des CaMKII/MUPP1-Komplexes herbeizuführen (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Krapivinsky, Medina et al. 2004), war die Präzipitation der testikulären CaMKII α mit den PDZ-Domänen 10 und/oder 11 von MUPP1 nicht vom Aktivitätszustand der Kinase abhängig.

6.4.2.2 Funktionelle Rolle der CaMKII-Interaktionsdomäne von MUPP1 für die spontane Akrosomreaktion

Wie in Abschnitt 6.4.2.1 erwähnt, konnte in früheren Studien eine Funktion von MUPP1 während der Akrosomreaktion von Mausspermien bereits gezeigt werden (Ackermann, Zitanski et al. 2008). Dabei wurde beobachtet, dass ein Antikörper, der eine Peptidsequenz zwischen den PDZ-Domänen 5 und 6 von MUPP1 bindet und das Gerüstprotein so sterisch inhibiert, die Calcium-induzierte Akrosomreaktionsrate reduziert. Da eine Inhibition der CaMKII aber die spontane Exozytoserate steigert, also einen entgegengesetzten Effekt hat, stellte sich die Frage, welche Bedeutung der Komplex aus CaMKII α und MUPP1 für die Akrosomreaktion haben könnte. Daher erschien es wichtig festzustellen, welche Funktion speziell den beiden PDZ-Domänen des MUPP1-Proteins zukommt, an die die Spermien-CaMKII α bindet (Abbildung 6.30B), und ob eine kompetitive Verdrängung endogener CaMKII α vom MUPP1-Protein in Spermien Effekte auf die Akrosomreaktion hat.

Diese Überlegungen wurden mit Hilfe von SLO-permeabilisierten Spermien überprüft, die mit einem Überschuss (0,5 μ M) des MUPP1-GST-Fusionsproteins inkubiert wurden, das die PDZ-Domänen 10 und 11 umfasst. Anschließend wurde die spontane Akrosomreaktionsrate bestimmt. Da GST allein bereits einen leichten, wenn auch nicht signifikanten Einfluss auf die spontane Akrosomreaktionsrate hat (Lopez, Belmonte et al. 2007; nicht gezeigte Ergebnisse), wurde ein Ansatz zur Kontrolle der Spezifität potentieller Effekte des MUPP1-GST-Fusionsproteins der PDZ-Domänen 10 und 11 mitgeführt, der mit äquimolaren Mengen des MUPP1-GST-Fusionsproteins der PDZ-Domänen 12 bis 13 inkubiert wurde, das keine CaMKII-Bindung zeigt (Abbildung 6.31). In parallelen Ansätzen wurde zudem die basale Exozytoserate der Negativkontrolle ohne Zugabe eines Fusionsproteins bestimmt, die im Mittel $27,15 \pm 3,60$ % betrug. Zur Auswertung der quantifizierten Akrosomreaktionsraten wurden die erhaltenen Werte jeweils als Vielfaches dieser Basalrate der Negativkontrolle dargestellt.

Wie in Abbildung 6.32 zu erkennen, betrug die Potenzierung der spontanen Akrosomreaktionsrate (AR) durch Inkubation der Spermien mit dem MUPP1-GST-Fusionsprotein der PDZ-Domänen 10 und 11 (PDZ10-11) das $1,30 \pm 0,09$ -fache der basalen Exozytoserate der Negativkontrolle (Abbildung 6.32, [Kontrolle]: 1), wobei die statistische Auswertung eine hochsignifikante Abweichung bestätigte ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu hatte das Konstrukt der PDZ-Domänen 12 und 13 trotz der Homologie der MUPP1-PDZ-Domänen untereinander (Ullmer, Schmuck et al. 1998) keinen signifikanten Effekt auf die Potenzierung der akrosomalen Exozytoserate der Spermien (Abbildung 6.32, [PDZ12-13]: $1,04 \pm 0,12$).

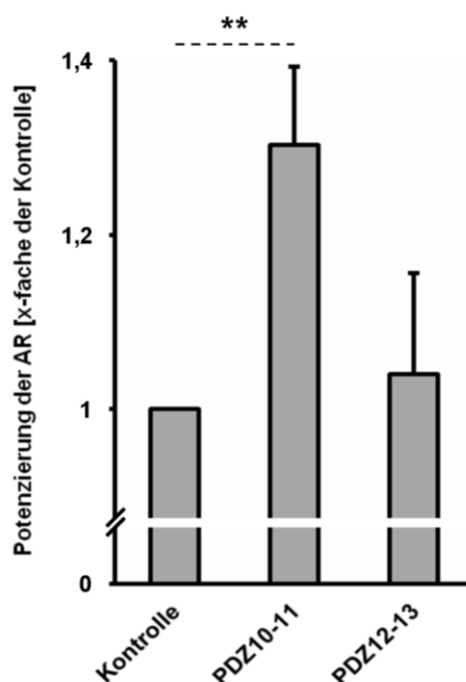


Abbildung 6.32: Funktion der CaMKII-MUPP1 Interaktion bei der spontanen Akrosomreaktion.

Der Einfluss der CaMKII-MUPP1 Interaktion auf die spontane Akrosomreaktionsrate wurde anhand von SLO-permeabilisierten Balb/C Mausspermien analysiert, die mit 0,5 μ M MUPP1-GST-Fusionsprotein der PDZ Domänen 10 bis 11 [PDZ10-11] inkubiert wurden. Zudem wurde die relative Akrosomreaktionsrate von Kontrollpermien bestimmt, denen entweder kein Fusionsprotein [Kontrolle] oder äquimolare Mengen eines anderen MUPP1-GST-Fusionsproteins [PDZ12-13] zugegeben wurden. Die kompetitive Verdrängung der CaMKII vom endogenen MUPP1 durch die Zugabe des PDZ10-11 führte zu einer signifikanten Erhöhung des spontanen Akrosomreaktionsindex im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen das MUPP1-GST-Fusionsprotein PDZ12-13 keinen signifikanten Effekt auf den Exozytoseindex hatte. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte der Akrosomreaktionsindices (s. Abschnitt 5.3.3.1) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM), die aus Daten von 12 (PDZ10-11) bzw. 5 (PDZ12-13) unabhängigen Spermienpräparationen berechnet wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe eines zweiseitigen studentischen T-Tests für ungepaarte Stichproben ermittelt und sind mit **: $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Die kompetitive Verdrängung der CaMKII vom endogenen MUPP1-Protein hatte also auch eine Erhöhung der spontanen Exozytose zur Folge, wie sie schon für die direkte Inhibition der Aktivität der CaMKII selbst beobachtet wurde (Abbildung 6.27). Da die CaMKII sich in Spermien initial bereits im aktiven Zustand befindet (Abbildung 6.29) und an das MUPP1-Protein bindet (Abbildung 6.30), könnte die Interaktion mit dem endogenen Gerüstprotein möglicherweise auch in Spermien für die Lokalisation der CaMKII-Aktivität in die Nähe potentiell zu phosphorylierender Substrate verantwortlich sein. Als Substrate kommen z.B. die an der Akrosomreaktion beteiligte Phosphoinositid-3- (PI_3 -) Kinase (Jungnickel, Sutton et al. 2007; Rotfeld, Hillman et al. 2014), die Proteine der SNARE-vermittelten Membranfusion (Hilfiker, Pieribone et al. 1999; Yokoyama, Myers et al. 2005) oder die für die Hyperpolarisation der Spermienmembran verantwortlichen Kalium-Kanäle der Slo-Familie in Frage (Clapham 2013; Mannowetz, Naidoo et al. 2013; Brenker, Zhou et al. 2014), die analog zu den SNARE-Proteinen (Hilfiker, Pieribone et al. 1999; Yokoyama, Myers et al. 2005) auch in Neuronen von der CaMKII phosphoryliert werden und so die Exozytose der synaptischen Vesikel regulieren können (Wang 2008).

6.4.3 Weiterer Bindungspartner eines MUPP1-Komplexes

Bemerkenswert ist, dass auch RIM-Proteine eine Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch die CaMKII besitzen (Sun, Bittner et al. 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass die *in vitro* Phosphorylierung des RIM1-Proteins durch die CaMKII sogar die Bindungsaffinität für seine Interaktionspartner verbessern kann (Sun, Bittner et al. 2003). Die Präzipitation einer testikulären CaMKII mit dem in Spermien identifizierten RIM2-Protein (Abbildung 6.14, 6.15 und 6.16) in einem der beiden massenspektrometrisch analysierten Immunpräzipitate (Tabelle 6.2, # 28) deutet an, dass das RIM2-Protein als Substrat für eine Phosphorylierung durch die CaMKII in Spermien in Frage kommt. Möglicherweise könnte dabei, analog zur Phosphorylierung von SynGAP durch die CaMKII (Krapivinsky, Medina et al. 2004), ein intermediäres Protein die räumliche Annäherung von CaMKII und RIM2 vermitteln. Ein Kandidat, dessen funktionelle Rolle während der Akrosomreaktion bereits bestätigt werden konnte (Ackermann, Zitanski et al. 2008; Abbildung 6.32), ist das MUPP1-Protein (s. Abschnitt 6.4.2). Um zu untersuchen, ob MUPP1 als „Brückenprotein“ zwischen CaMKII und RIM2 fungieren könnte, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit den MUPP1-GST-Fusionsproteinen und solubilisierten Rattenhoden-Membranfraktionen durchgeführt. Im Immunoblot wurde anschließend mit Hilfe des spezifischen anti-RIM2 Antikörpers die Bindung des RIM2-Proteins an die Fusionsproteine der verschiedenen PDZ-Domänen von MUPP1 analysiert (Abbildung 6.30A).

Zur Überprüfung, ob potentiell detektierbare Interaktionen aufgrund unterschiedlicher Beladung des SDS-PAGE-Gels oder aufgrund von experimentell bedingten Varianzen bei der Affinitätsreinigung registriert wurden, wurden die affinitätsgereinigten Proteinkomplexe in zusätzlichen Immunoblots mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers analysiert und außerdem der Nitrozellulosebogen mit Ponceau S gefärbt. Beide Kontrollen zeigten vergleichbar intensiv gefärbte bzw. immunmarkierte Banden der MUPP1-GST-Proteine (nicht gezeigt) und belegen damit, dass gleiche Mengen der Fusionsproteine in allen Ansätzen vorhanden waren.

Es zeigte sich, dass RIM2-immunreaktive Banden, die bezüglich des Molekulargewichts den Banden der für die Interaktionsstudien eingesetzten solubilisierten Hoden-Membranfraktion entsprachen (Abbildung 6.33, [Testislysate]), fast ausschließlich in der Spur der PDZ-Domänen 6 bis 9 von MUPP1 nachzuweisen waren (Abbildung 6.33, [PDZ6-9]). Neben dieser starken Interaktion war außerdem eine leichte Bindung von RIM2 an die MUPP1-PDZ-Domänen 10 und 11 zu beobachten (Abbildung 6.33, [PDZ10-11]). In allen weiteren MUPP1-PDZ-Domänen und in der Kontrolle mit nicht fusioniertem GST war trotz der hohen Homologie der einzelnen PDZ-Domänen untereinander (Ullmer, Schmuck et al. 1998), keine RIM2-Immunmarkierung zu verzeichnen (Abbildung 6.33).

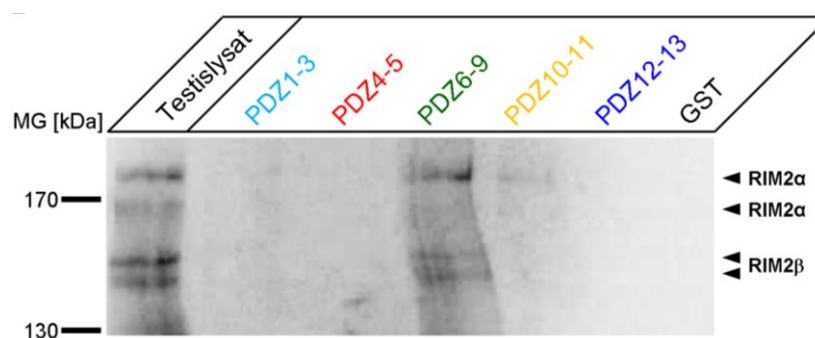


Abbildung 6.33: Interaktion von MUPP1-GST-Fusionsproteinen und testikulärem RIM2.

Eine mögliche Interaktion von RIM2 und MUPP1 wurde in *in vitro* Bindungsstudien mit MUPP1-GST-Fusionsproteinen (Abbildung 6.30A) und solubilisierten Membranfraktionen aus Rattenhoden [Testislysat] analysiert. Affinitätsgereinigte Proteinkomplexe wurden anschließend im Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen anti-RIM2 Antikörpers auf die Bindung des RIM2-Proteins hin überprüft. Dabei zeigte sich im eingesetzten Hodenlysat das für das RIM2-Protein typische Leiter-artige Bandenmuster. Dasselbe Muster zeigte sich außerdem am stärksten in der Spur des Fusionsproteins, das die PDZ-Domänen 6 bis 9 des MUPP1-Proteins umfasst [PDZ6-9]. Eine leichte Interaktion war auch für das Konstrukt der MUPP1-PDZ-Domänen 10 und 11 zu registrieren [PDZ10-11], wohingegen die Spur des nicht fusionierten GSTs und die Spuren aller weiteren Fusionsproteine keine Immunreaktivität aufwiesen. Um sicherzugehen, dass die eingesetzte Menge der GST-Fusionsproteine in allen Ansätzen vergleichbar war, wurden Aliquots der untersuchten Proben in zusätzlichen Immunoblots überprüft, die mit Hilfe eines anti-GST Antikörpers analysiert und mit Ponceau S gefärbt wurden (nicht gezeigt). Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben; die Pfeile auf der rechten Seite deuten die molekulare Größe der genannten RIM2-Subtypen an. Der gezeigte Immunoblot ist eine repräsentative Abbildung von mindestens drei Wiederholungen mit unabhängigen Gewebepräparationen. GST: nicht fusionierte Glutathion S-Transferase.

Testikuläres RIM2 scheint demnach an das MUPP1-Protein binden zu können. Neben dem Konstrukt, das auch die CaMKII α -bindenden MUPP1-Domänen enthält (Abbildung 6.30B, [PDZ10-11]), ist für die Bindung vor allem das MUPP1-GST-Fusionsprotein verantwortlich, das die PDZ-Domänen 6 bis 9 enthält (Abbildung 6.33). Die kräftigste Bindung des RIM2-Proteins an MUPP1 erfolgte also nicht an die CaMKII-interagierenden Domänen von MUPP1, sondern an distinkte PDZ-Domänen, die in der Primärstruktur des MUPP1-Proteins den CaMKII-Bindungsdomänen direkt benachbart sind.

7 Diskussion

7.1 Die akrosomale Synapse in Spermien

Eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation einer Eizelle ist die vorangehende Akrosomreaktion des Spermiums (Sebkova, Ded et al. 2014). Die Akrosomreaktion dient nicht nur dazu, die akrosomalen hydrolytischen Enzyme freizusetzen, die das Spermium bei der Penetration der *Zona pellucida* unterstützen (Tranter, Read et al. 2000), sondern auch dazu, die innere akrosomale Membran freizulegen, auf der das für die Befruchtung essentielle Izumo-Protein lokalisiert ist (Bianchi, Doe et al. 2014). Der Prozess der Akrosomreaktion folgt im Wesentlichen den Grundprinzipien der Calcium-vermittelten Exozytose (Tomes 2007). Die molekularen Organisations- und Regulationsmechanismen, die die präzise Positionierung der vielen einzelnen SNARE-Komplexe und die Reißverschluss-artige, großflächige Pseudovesikelbildung zur Freilegung von ausreichend vielen Izumo-Molekülen regulieren (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009), sind bislang jedoch weitgehend unverstanden.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Befunde deuten in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass die *cytomatrix of the active zone* (CAZ)-Proteine Piccolo/Aczonin, ubMunc13-2 und RIM2, die in Neuronen das präsynaptische Netzwerk der aktiven Zone bilden (Sudhof 2012), in Spermien ein analoges Proteinnetzwerk ausbilden könnten. Da die Funktion der CAZ darin besteht, die räumliche und temporale Präzision der Vesikelexozytose zu gewährleisten (Sudhof 2012), könnten die CAZ-Proteine in Spermien den komplexen Prozess der multiplen Membranfusion während der Akrosomreaktion sicherstellen. Dafür sprechen die folgenden, im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Befunde: I) Alle drei Gerüstproteine sind in der akrosomalen Region von Nagerspermien lokalisiert (Abbildung 6.1, 6.9, 6.10, 6.16 und 6.22). II) ubMunc13-2 und RIM2 sind an Caveolin-1 enthaltende spezialisierte Membranbereiche der Spermien assoziiert (Abbildung 6.11 und 6.17), die auch die SNARE-Fusionsproteine der akrosomalen Synapse zur Sicherstellung einer homogenen Pseudovesikelbildung konzentrieren (Travis, Merdushev et al. 2001; Boerke, Tsai et al. 2008; Tsai, Brewis et al. 2012). III) Eine selektive Blockierung einzelner Bindungsmodule der drei CAZ-Proteine führt zu einer Reduzierung des akrosomalen Exozytoseindex (Abbildung 6.2C, 6.12C, 6.20C und 6.25). Dabei scheinen verschiedene Interaktionsdomänen aller drei

CAZ-Proteine für die akrosomale Exozytose von vergleichbarer funktioneller Bedeutung zu sein. Dadurch ergibt sich die erste Schlussfolgerung, dass weniger die Funktion einzelner Bindungsmodule, sondern im Hinblick auf den Ablauf der Pseudovesikelbildung, eher deren Zusammenspiel für die präzise Koordination der komplexen Akrosomreaktion essentiell ist. IV) Schließlich konnte in *in vitro* Interaktionsstudien mit Hodenfraktionen bestätigt werden, dass dem testikulären RIM2-Protein, analog zur neuronalen Synapse (Sudhof 2012), eine zentrale Rolle als „molekularer Knotenpunkt“ für die Rekrutierung von weiteren CAZ-Proteinen, aber auch von Komponenten der akrosomalen Exozytosemaschinerie zukommt (Abbildung 6.18, 6.19 und Tabelle 6.2).

Abbildung 7.1 stellt ein vorläufiges Modell der potentiellen Interaktionsmöglichkeiten der CAZ-Proteine (farbig hervorgehoben) und der Komponenten des Exozytose-Apparates der „akrosomalen Synapse“ dar. Dieses auf der Basis der bisherigen Literatur und der in dieser Arbeit gesammelten Befunde erstellte Modell wird im Folgenden bezüglich seiner funktionellen Bedeutung für die Akrosomreaktion näher erläutert und diskutiert. Dabei wird neben der Funktion eines solchen RIM2-basierten Protein-Netzwerkes auch dessen Assoziation an *membrane rafts* sowie die funktionelle Bedeutung eines dualen Gerüstprotein- und Lipid-basierten Organisationsprinzips für die besonderen räumlichen Anforderungen zur Sicherstellung der akrosomalen Exozytose diskutiert. Des Weiteren werden die Auswirkungen einer Deletion des RIM2 α -Proteins bei Mäusen für dessen funktionelle Rolle bei der Akrosomreaktion in Spermien erörtert.

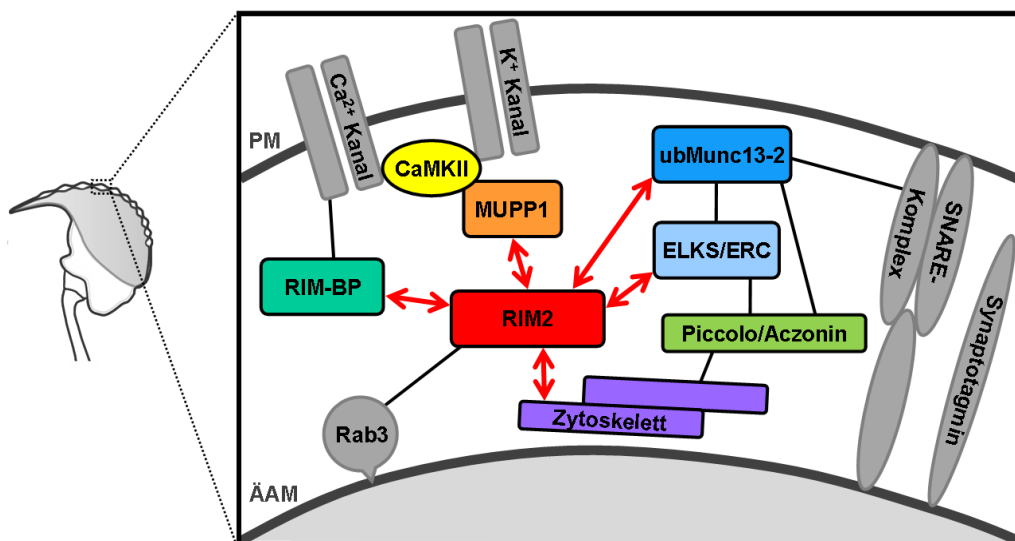


Abbildung 7.1: Modellvorstellung zur Rolle von RIM2 als molekularer Knotenpunkt der akrosomalen Synapse.

Die schematische Darstellung fasst die in der vorliegenden Arbeit identifizierten potentiellen Bindungspartner des RIM2-Proteins (mit roten Doppelpfeilen markiert) zusammen. Aus dem endokrinen, neuronalen oder Reproduktionssystem bereits bekannte Interaktionsmöglichkeiten sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die potentiellen Funktionen der einzelnen Proteinkomplexe sind in Abbildung 7.2 zusammengefasst.

7.1.1 Funktionelle Bedeutung eines RIM2-Munc13-Komplexes für das *priming* des akrosomalen Vesikels

Durch die Interaktion mit den α -Isoformen der RIM-Proteine wird an der neuronalen Synapse die Autoinhibition der Munc13-1- und ubMunc13-2-Proteine aufgehoben und so die Vesikel-*priming* Funktion dieser beiden Munc13-Isoformen aktiviert (Deng, Kaeser et al. 2011). Der Nachweis der Bindung des in Spermien vorherrschenden RIM2 α -Proteins (Abbildung 6.14, 6.15 und 6.17) an das ubMunc13-2-Protein im männlichen Reproduktionssystem (Tabelle 6.2, # 16) und der experimentelle Beleg, dass die für die RIM-Bindung verantwortliche Domäne von Munc13 bei der Calcium-induzierten Akrosomreaktion eine wichtige funktionelle Rolle spielt (Abbildung 6.12C), lassen eine analoge Funktion dieses Bindungspaares in Spermien vermuten (Bello, Zanetti et al. 2012). Dabei könnte man auf der Basis der bisherigen Erkenntnisse an der neuronalen Synapse (Deng, Kaeser et al. 2011) vermuten, dass die Verdrängung des Munc13-Proteins aus dem inaktiven Homodimer und die anschließende Bildung des Heterodimers aus RIM2 und Munc13 die initialen Schlüsselereignisse für das *priming* des akrosomalen Vesikels darstellen. Als Folge davon wäre denkbar, dass Munc13 in Spermien die SNARE-Paarung während der Kapazitation und/oder der anschließenden Akrosomreaktion fördert (Tsai, Brewis et al. 2012), indem es die offene Konformation von Syntaxin stabilisiert (Richmond, Weimer et al. 2001; Ma, Li et al. 2011). Nur in dieser offenen Konformation kann Syntaxin die Interaktion mit VAMP und mit SNAP-23 eingehen, sodass der SNARE-Komplex ausgebildet werden kann (Gerber, Rah et al. 2008; Ma, Li et al. 2011).

Die *in vitro* Interaktionsstudien mit den RIM2-GST-Fusionsproteinen führten hauptsächlich zum Bindungsnachweis der testikulären Munc13-1-Isoform an RIM2 (Abbildung 6.18). Im Gegensatz dazu erbrachten die Immunpräzipitationsstudien mit dem anti-RIM2 Antikörper ausschließlich einen Interaktionsnachweis von endogenem RIM2 mit der ubMunc13-2-Isoform (Tabelle 6.2, # 16). Diese Diskrepanz könnte auf unterschiedliche Affinitäten der beiden Munc13-Proteine zum RIM2-Protein zurückzuführen sein. Jedoch haben vergleichbare *in vitro* Interaktionsstudien keine offensichtlichen Unterschiede in der Affinität von RIM-Proteinen zu Munc13-1- bzw. ubMunc13-2-GFP-Fusionsproteinen gezeigt (Junge, Rhee et al. 2004). Folglich sind mit höherer Wahrscheinlichkeit abweichende Detergens-Konzentrationen während der experimentellen Durchführung für die nur teilweise übereinstimmenden Befunde verantwortlich. Für die *GST pull down* Studien wurde zunächst eine Fraktionierung des verwendeten Hodengewebes zur Anreicherung Membran-ständiger und -assoziiierter Proteine vorgenommen, für deren Solubilisierung hohe Detergens-Konzentrationen (s. Abschnitt 5.2.5.2) benötigt wurden. Jedoch können hohe Detergens-Konzentrationen die Affinität von Protein-Protein-Interaktionen verringern, während geringe Detergens-Konzentrationen diese im Einzelfall sogar erhöhen können (Yang,

Zhang et al. 2009). Deswegen wurde in den später durchgeführten Immunpräzipitationsstudien zur Solubilisierung des gesamten Hodengewebes (s. Abschnitt 5.2.5.3) eine deutlich geringere Detergens-Konzentration als in den vorangegangenen *GST pull down* Studien verwendet. Es wurde also weder eine vorherige Selektion Membran-assoziiierter Proteine vorgenommen noch die Affinität der Protein-Protein-Interaktionen durch eine hohe Detergens-Konzentration verändert (Yang, Zhang et al. 2009). Außerdem wurde in den Immunpräzipitationsstudien die Bindung von endogenem RIM2 und endogenem ubMunc13-2 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde im *GST pull down* die Bindung des testikulären Munc13-1-Proteins an rekombinante, in Bakterien überexprimierte RIM2-GST-Fusionsproteine beobachtet. Zusammengenommen deuten die Erläuterungen und die Befunde der RIM2-Co-Immunpräzipitationen (Tabelle 6.2, # 16) darauf hin, dass das ubMunc13-2-Protein der prädominante endogene Interaktionspartner von RIM2 im männlichen Reproduktionssystem ist.

Interessanterweise kann die Vesikel-*priming* Funktion der Munc13-Proteine durch *second messenger* reguliert werden, was als eine der molekularen Grundlagen für Aktivitäts-abhängige Veränderungen der Neurotransmission und damit der präsynaptischen Plastizität diskutiert wird (Rhee, Betz et al. 2002; Junge, Rhee et al. 2004; Shin, Lu et al. 2010). Ein *second messenger*, der an der Präsynapse für die Regulation der *priming*-Funktion des Munc13-Proteins verantwortlich ist, ist z. B. das PLC-Produkt DAG (Rhee, Betz et al. 2002). Des Weiteren können Calcium-Ionen entweder durch direkte Bindung an Munc13 (Zikich, Mezer et al. 2008; Shin, Lu et al. 2010) oder aber im Komplex mit dem Calcium-Sensorprotein Calmodulin (Junge, Rhee et al. 2004; Zikich, Mezer et al. 2008) diese Regulation bewerkstelligen. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass alle drei *second messenger* (Calcium-Ionen, Calcium/Calmodulin und DAG) auch eine zentrale Rolle bei der Regulation der Akrosomreaktion in Säugerspermien einnehmen (Yanagimachi 1994; Breitbart 2002; Yunes, Tomes et al. 2002). Daher könnte man vermuten, dass das in Spermien identifizierte ubMunc13-2-Protein (Abbildung 6.7) eine integrierende Zielstruktur für diese verschiedenen intrazellulären Signalwege darstellt, die die Akrosomreaktion vermitteln. Dabei könnte ubMunc13-2 dazu beitragen die schrittweise stattfindenden Erhöhungen der zytosolischen Calcium-Konzentration während der Kapazitation und der anschließenden Akrosomreaktion (Abbildung 3.4) in die sequentielle Assoziation der beiden aufeinander folgenden SNARE-Komplexe (Tsai, Brewis et al. 2012) zu übersetzen. Dies könnte sowohl die initiale Anlagerung als auch die spätere Fusion des akrosomalen Vesikels ermöglichen. Es wird vermutet, dass der erste, Kapazitationsbedingte SNARE-Komplex die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran so einander annähert, dass die Bildung des zweiten, die eigentliche Fusion vollführenden SNARE-Komplexes erleichtert wird (Tsai, Brewis et al. 2012). Folglich könnte Munc13

als SNARE-Regulator im Zusammenspiel mit RIM2 die Einzelfusionen dieser insgesamt großflächigen Exozytosereaktion koordinieren.

7.1.2 Potentieller *docking*-Komplex aus Rab3 und RIM2

Neben der oben beschriebenen Aktivierungsfunktion von Munc13-Proteinen für das Vesikel-*priming*, könnten RIM-Proteine in Spermien auch für das *docking* des akrosomalen Vesikels verantwortlich sein. Eine erste Studie, die eine funktionelle Rolle von RIM-Proteinen in humanen Spermien beschreibt und die während der laufenden experimentellen Studien zu der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde, belegt, dass RIM-Proteine die Anlagerung des akrosomalen Vesikels an die Plasmamembran vermitteln (Bello, Zanetti et al. 2012). Diese Anlagerung ist auch von der kleinen GTPase Rab3A abhängig (Bello, Zanetti et al. 2012), die der namensgebende Interaktionspartner der RIM-Proteine ist (Wang, Okamoto et al. 1997). Da Rab3-Proteine jedoch nur im GTP-gebundenen Zustand an Vesikelmembranen (Burstein, Brondyk et al. 1993) und an RIM-Proteine binden (Wang, Okamoto et al. 1997), überrascht es nicht, dass Rab3-Proteine ohne Zusatz von GTP in der Immunpräzipitation des RIM2-Proteins nicht identifiziert wurden (Tabelle 6.2). Das Enzym, das den Übergang von der GTP-gebundenen zur GDP-gebundenen Form des Rab3-Proteins vermittelt und damit vermutlich die Membranfusion fördert (Fukui, Sasaki et al. 1997), das *Rab3 GTPase-activating protein*, wurde allerdings als testikulärer Bindungspartner des RIM2-Proteins identifiziert (Tabelle 6.2, # 26 und # 27). Dieser Befund gibt einen indirekten Hinweis auf einen möglichen, das *docking* des Akrosoms vermittelnden Komplex aus RIM2- und Rab3-Proteinen.

Im Zusammenhang mit der Funktion von Rab3 in Spermien muss an dieser Stelle auf einen weiteren, im neuroendokrinen System identifizierten RIM-Interaktionspartner hingewiesen werden – der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor EPAC (Fujimoto, Shibasaki et al. 2002). Für die Funktion von EPAC in Spermien wird gegenwärtig diskutiert, dass es bei der cAMP-induzierten Akrosomreaktion als indirekter Aktivator von Rab3A eine Rolle spielt (Branham, Bustos et al. 2009). Obwohl das exakte Zusammenspiel zwischen RIM2, EPAC und Rab3 während der Akrosomreaktion noch nicht aufgeklärt werden konnte, wird gegenwärtig angenommen, dass RIM-Proteine als molekulare Brücke zwischen EPAC und Rab3 fungieren könnten (Branham, Bustos et al. 2009). Der Befund, dass EPAC in den bisher durchgeführten Immunpräzipitationsstudien nicht als testikulärer Bindungspartner von RIM2 identifiziert werden konnte (Tabelle 6.2), schließt jedoch nicht aus, dass die Interaktion zwischen EPAC und RIM2 nur transient stattfindet. Möglich ist auch, dass EPAC und RIM2 erst nach der Aktivierung des EPAC-Proteins durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration während der Kapazitation und/oder Akrosomreaktion der Spermien interagieren (Branham, Mayorga et al. 2006; Xie, Garcia

et al. 2006; Visconti 2009). Daher sollte in zukünftigen Immunpräzipitationen in Gegenwart des cAMP-Analogs 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, das nicht die PKA, sondern selektiv das EPAC-Protein aktiviert (Enserink, Christensen et al. 2002; Kang, Joseph et al. 2003), geprüft werden, ob die Bindung von EPAC an das RIM2-Protein von der Aktivierung durch cAMP abhängig ist.

7.1.3 RIMs Funktion für die Rekrutierung von Calcium-Kanälen und damit für das *positional priming*

In jüngsten Studien aus dem Labor von Prof. Dr. Thomas Südhof konnte eine dritte, für die Neurotransmission essentielle Funktion von RIM-Proteinen nachgewiesen werden. Diese basiert auf der Interaktion von RIM-Proteinen mit den CAZ-Gerüstproteinen der RIM-BP-Familie und der gleichzeitigen Rekrutierung von Spannungs-abhängigen Calcium-Kanälen (Ca_v -Kanäle) der aktiven Zone (Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011). Dabei hat sich gezeigt, dass RIM-Proteine mit RIM-Bindeproteinen und Ca_v -Kanälen einen trimeren Komplex ausbilden (Wang, Sugita et al. 2000; Hibino, Pironkova et al. 2002), der eine aktive Positionierung der Kanäle in die aktive Zone und damit deren räumliche Nähe zu den synaptischen Vesikeln vermittelt (Hibino, Pironkova et al. 2002; Han, Kaeser et al. 2011; Kaeser, Deng et al. 2011). Durch diese Annäherung wird zum einen die Diffusionsstrecke zum vesikulären Calcium-Sensorprotein Synaptotagmin für die durch die Ca_v -Kanäle einströmenden Calcium-Ionen verringert und so die Geschwindigkeit der Membranfusion erhöht. Zum anderen wird ein definierter räumlicher Abstand zwischen einzelnen synaptischen Vesikeln und der Plasmamembran festgelegt, was zur Synchronizität der Exozytose multipler Vesikel beiträgt (Kaeser, Deng et al. 2011). In diesem RIM2-RIM-BP- Ca_v -Kanal-Komplex scheinen RIM-Proteine für die selektive Interaktion mit den synaptischen Ca_v -Kanälen verantwortlich zu sein (Kaeser, Deng et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte für RIM-Bindeproteine eine weniger selektive Bindung verschiedener Ca_v -Kanaltypen gezeigt werden (Hibino, Pironkova et al. 2002). Diese schließt die Rekrutierung nicht-synaptischer Ca_v -Kanäle bei Calcium-regulierten Exozytoseprozessen in anderen zellulären Systemen ein, z.B. bei der Hormonsekretion neuroendokriner Zellen (Hibino, Pironkova et al. 2002; Südhof 2012). Die RIM-Bindeproteine stellen dabei die Verbindung zwischen dem Vesikel-assoziierten Rab3-RIM-Komplex (s. Abschnitt 7.1.2) und den Ca_v -Kanälen der Plasmamembran her und gewährleisten so die räumliche Annäherung der Vesikel an die Plasmamembran (Hibino, Pironkova et al. 2002).

Bislang ist lediglich eine Interaktion von RIM-Proteinen mit den neuronalen RIM-Bindeprotein-Isoformen RIM-BP1 und RIM-BP2 experimentell belegt (Hibino, Pironkova et al. 2002; Kaeser, Deng et al. 2011). Eine Bindung der erst später identifizierten testikulären RIM-BP-Isoform RIM-BP3 (Mittelstaedt und Schoch 2007; Zhou, Du et al. 2009) an RIM-Proteine wurde jedoch noch nicht publiziert. In der vorliegenden Arbeit

konnte erstmalig gezeigt werden, dass RIM-BP3 an dieselbe Bindungsdomäne des RIM2-Proteins binden kann wie die neuronalen RIM-BP-Isoformen (Abbildung 6.19). RIM-BP3 ist zudem nicht nur im Hoden (Zhou, Du et al. 2009), sondern auch in reifen Spermien exprimiert (Bachelorarbeit Franziska Henze, 2011). Daher könnte RIM-BP3 in Spermien, analog zu RIM-BP1 und RIM-BP2 in neuroendokrinen Zellen (Hibino, Pironkova et al. 2002), eine Verbindung zwischen RIM2-Proteinen und an der Akrosomreaktion beteiligten Ca_v -Kanälen herstellen (Arnoult, Cardullo et al. 1996; Wennemuth, Westenbroek et al. 2000). Damit könnte der Komplex aus RIM2, RIM-BP3 und Ca_v -Kanälen die Fusions-bereiten SNARE-Komplexe in die direkte Nähe zum Calcium-Einstrom lokalisieren und so die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der multiplen Fusionsporenbildung bei der akrosomalen Exozytose gewährleisten.

Kürzlich konnte mit Hilfe der *Patch-clamp* Technik gezeigt werden, dass in Spermien hauptsächlich Calcium-Ströme des CatSper-Kanals zu detektieren sind (Xia und Ren 2009; Lishko, Kirichok et al. 2012). Auch wenn für diese Spermien-spezifischen Calcium-Kanäle bislang hauptsächlich Funktionen bei der Kapazitation und der Chemotaxis belegt sind (Brenker, Goodwin et al. 2012; Lishko, Kirichok et al. 2012), sollte in weiterführenden Studien auch eine mögliche Interaktion von RIM-Proteinen und/oder RIM-Bindeproteinen mit diesen einzigartigen Calcium-Kanälen überprüft werden.

7.1.4 Das RIM2-Proteinnetzwerk: Potentielle Funktion weiterer identifizierter RIM-Interaktionspartner und Assoziationen zum Zytoskelett

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Analysen konnte erstmalig die Expression des ELKS/ERC2-Proteins in Testisgewebe nachgewiesen werden (Tabelle 6.2, # 23). ELKS/ERC2 ist ein Protein des CAZ-Netzwerkes (Wang, Liu et al. 2002), über dessen Funktion bislang nur wenig bekannt ist (Sudhof 2012). Die unterschiedlichen experimentellen Ansätze zur Analyse der Funktion von ELKS/ERC-Proteinen reichen von der genetischen Deletion der ELKS/ERC-Proteine in *Caenorhabditis elegans* (Deken, Vincent et al. 2005) bzw. Mäusen (Kaesler, Deng et al. 2009) bis hin zu Kompetitionsstudien zwischen endogenem ELKS/ERC und rekombinant exprimiertem ELKS/ERC in kultivierten Rattenneuronen (Takao-Rikitsu, Mochida et al. 2004) und haben zu sich widersprechenden Befunden geführt. Da das ELKS/ERC-Protein ursprünglich als Rab6-Bindungspartner identifiziert wurde, wird bisher angenommen, dass es an vesikulären Membrantransportprozessen des Golgi-Netzwerkes beteiligt ist (Monier, Jollivet et al. 2002). Seine zusätzliche Interaktion mit RIM-Proteinen (Ohtsuka, Takao-Rikitsu et al. 2002; Wang, Liu et al. 2002) könnte in Neuronen eine Verbindung zwischen dem Golgi-Komplex und der aktiven Zone

darstellen (Sudhof 2012). Ob dieses CAZ-Protein jedoch auch im Hoden vesikuläre Transportprozesse und/oder sogar die Bildung des ontogenetisch dem Golgi-Netzwerk entstammenden Akrosoms (Kierszenbaum, Rivkin et al. 2007) unterstützt, gilt es in zukünftigen Studien zu überprüfen. ELKS/ERC-Proteine können aber auch mit β -Untereinheiten von Ca_v -Kanälen interagieren (Kiyonaka, Nakajima et al. 2012). Daher wäre zudem denkbar, dass ELKS/ERC2 einen potentiellen trimeren Komplex aus RIM-Proteinen, RIM-Bindeproteinen und Ca_v -Kanälen (s. Abschnitt 7.1.3) zusätzlich als „Brückenprotein“ unterstützt und damit an einem CAZ-ähnlichen Netzwerk in Spermien direkt beteiligt ist.

In Bezug auf die mögliche Funktion des ELKS/ERC2-Proteins in Spermien sollte aber auch berücksichtigt werden, dass in neuronalen Synapsen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* im Gegensatz zu Mammalia und *Caenorhabditis elegans* kein klassisches ELKS/ERC-Protein, sondern ein Fusionsprotein namens Bruchpilot exprimiert wird. Bruchpilot ist aus einer N-terminalen ELKS/ERC-Domäne und einem C-Terminus, der Homologien zu dem Zytoskelett-Ankerprotein Plectin aufweist, zusammengesetzt (Wagh, Rasse et al. 2006; Castanon, Walko et al. 2013). Dieses Fusionsprotein scheint sowohl für die synaptische Transmission als auch für die Struktur der aktiven Zone in *Drosophila melanogaster* eine deutlich wichtigere funktionelle Rolle zu spielen (Kittel, Wichmann et al. 2006) als das ELKS/ERC-Protein bei Säugern bzw. *Caenorhabditis elegans* (Sudhof 2012). Allerdings konnte diese funktionelle Relevanz weniger dem ELKS/ERC-ähnlichen N-Terminus von Bruchpilot als vielmehr den C-terminalen, zum Plectin homologen Domänen zugeordnet werden (Hallermann, Heckmann et al. 2010). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Funktion des Plectin-Teils als Ankerprotein des Zytoskeletts hierbei im Vordergrund steht.

Interessanterweise wurde Plectin in der vorliegenden Arbeit auch als Bindungspartner von RIM2 im männlichen Reproduktionssystem identifiziert (Tabelle 6.2, # 1). Obwohl Plectin zusammen mit CAZ-Proteinen wie z. B. Bassoon in Fraktionen synaptischer Spezialisierungen nachgewiesen wurde (Li, Hornshaw et al. 2004), wird es im Hodenepithel vor allem in Sertoli-Zellen auf der Kernoberfläche, in Desmosomen-ähnlichen Strukturen und Zytoplasma-Regionen, die den elongierten Spermatiden benachbart sind, exprimiert (Guttman, Mulholland et al. 1999; Ketema, Kreft et al. 2013). Neben den Sertoli-Zellen sind die interzellulären Brücken zwischen den Spermiovorläuferzellen die einzige Region, in der bislang ebenfalls Plectin-Immunfluoreszenz im Hodenepithel nachgewiesen wurde (Guttman, Mulholland et al. 1999; Ketema, Kreft et al. 2013). Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für Vimentin beobachtet (Guttman, Mulholland et al. 1999; Ketema, Kreft et al. 2013), ein weiteres, als testikulärer RIM2-Bindungspartner identifiziertes Zytoskelett-assoziiertes Protein (Tabelle 6.2, # 6). Ob zudem möglicherweise Plectin- und Vimentin-Moleküle mit RIM2-Proteinen in der akrosomalen Region der Spermatozyten co-lokalisiert sind (Abbildung 6.22) und damit als physiologischer Interaktionspartner von RIM2 im

männlichen Reproduktionssystem in Betracht kommen, sollte in weiterführenden Studien geprüft werden.

Im Gegensatz zu Plectin und Vimentin ist für Gelsolin, ein weiteres Zytoskelett-assoziiertes Protein, das mit RIM2 aus Hodengewebe co-präzipitiert wurde (Tabelle 6.2, # 8), sogar bereits eine funktionelle Rolle während der Akrosomreaktion von Säugerspermien belegt (Ickowicz, Finkelstein et al. 2012). Gelsolin ist für die Depolymerisation von F-Aktin-Filamenten essentiell, die der akrosomalen Exozytose vorangeht (Sun, Yamamoto et al. 1999). Während der Kapazitation der Spermien wird Gelsolin zunächst durch PIP_2 und die Phosphorylierung durch Src-Kinasen im inaktiven Zustand gehalten, sodass sich polymerisiertes F-Aktin an der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran der Spermien anlagern kann (Ickowicz, Finkelstein et al. 2012). Diese Aktin-Filamente stellen eine effektive Barriere für eine Membranfusion und damit für die akrosomale Exozytose dar (Brener, Rubinstein et al. 2003). Durch den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration am Beginn des sequentiellen Akrosomreaktionsprozesses (Breitbart 2002; Darszon, Nishigaki et al. 2011) wird die PLC aktiviert (Fukami, Yoshida et al. 2003) und spaltet PIP_2 , wodurch das daran gebundene Gelsolin frei wird (Ickowicz, Finkelstein et al. 2012). Monomeres Gelsolin kann dann dephosphoryliert und damit aktiviert werden und bewirkt den schnellen Abbau von F-Aktin-Filamenten (Ickowicz, Finkelstein et al. 2012), der der Pseudovesikelbildung während der Akrosomreaktion von Säugerspermien vorausgehen muss (Brener, Rubinstein et al. 2003). Somit wäre denkbar, dass ein potentieller Komplex aus Gelsolin, RIM2 und den Calcium-Kanälen (s. Abschnitt 7.1.3) in Spermien die räumliche Nähe von Signal (Calcium-Einstrom) und Effektor (Gelsolin) gewährleistet und so die PLC-abhängige Aktivierung von Gelsolin für die Aktin-Depolymerisation begünstigt.

Paradoxerweise scheint neben der Barrierefunktion von F-Aktin für die akrosomale Exozytose (Brener, Rubinstein et al. 2003) auch polymerisiertes F-Aktin eine wichtige Bedeutung für die Akrosomreaktion zu haben. Die akrosomale Exozytose läuft nur dann ab, wenn zuvor während der Kapazitation die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin stattgefunden hat (Brener, Rubinstein et al. 2003). In neuronalen Synapsen unterstützt das Piccolo/Aczonin-Protein die Aktivitäts-abhängige F-Aktin-Polymerisation (Waites, Leal-Ortiz et al. 2011), wodurch es die Neurotransmitter-Sekretion mit Hilfe der Barrierefunktion von F-Aktin für die Membranfusion inhibiert (Waites, Leal-Ortiz et al. 2011). Die Exozytose des akrosomalen Vesikels hingegen wird durch Piccolo/Aczonin gefördert (Abbildung 6.2C) – eine Beobachtung, die sich mit der Netzwerk-Funktion aller identifizierten CAZ-Proteine in Spermien erklären ließe (s. o.). Jedoch wäre in diesem Fall auch eine funktionelle Rolle des nahe verwandten Bassoon-Proteins (Abbildung 3.10) für die Akrosomreaktion zu erwarten gewesen, das in Neuronen teilweise mit Piccolo/Aczonin überlappende Funktionen bei der Bildung und der Aufrechterhaltung von synaptischen Verbindungen ausübt (Mukherjee, Yang et al.

2010; Waites, Leal-Ortiz et al. 2013; Mendoza Schulz, Jing et al. 2014). Eine Funktion, in der sich die beiden riesigen Multidomänenproteine in Neuronen jedoch unterscheiden ist die Förderung der Polymerisation von F-Aktin und die dadurch bedingte Rekrutierung von Signalmolekülen wie der CaMKII (Tao-Cheng, Dosemeci et al. 2006; Waites, Leal-Ortiz et al. 2011), einem Schlüsselenzym für die verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität (Wang 2008). Daher ist es wahrscheinlicher, dass diese Piccolo/Aczonin-spezifische Funktion (Waites, Leal-Ortiz et al. 2011) in Spermien durch die sterische Blockierung des Piccolo/Aczonin-Proteins unterbunden wird (Abbildung 6.2C). Somit wäre denkbar, dass Piccolo/Aczonin in Spermien die F-Aktin-Bildung unterstützt, die möglicherweise für die korrekte räumliche Ausrichtung der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran verantwortlich sein könnte (Brener, Rubinstein et al. 2003). Zusammen mit der CaMKII könnte somit ein Arrest bewirkt werden, nach dessen De-Arretierung die spezielle, großflächige Exozytose erst erfolgreich ablaufen kann (Brener, Rubinstein et al. 2003; Ackermann, Zittronski et al. 2009).

7.1.5 Bedeutung eines MUPP1–CaMKII-Komplexes für die spontane Akrosomreaktion

Die funktionellen Studien zur Funktion der CaMKII während der Akrosomreaktion haben ergeben, dass die CaMKII eine spontane akrosomale Exozytose und damit den Verlust des einzigen Vesikels eines Spermiums verhindert (Abbildung 6.27). Dabei weisen bereits nicht-kapazitierte epididymale Spermien eine autonom aktive, nicht Calmodulin-responsive CaMKII α auf (s. Abschnitt 6.4.1.2). Der Befund, dass die Akrosomreaktionsrate dennoch durch Zugabe des Calmodulin-Antagonisten W7 gesteigert wird (Dissertation Frauke Ackermann, 2008; Ackermann, Zittronski et al. 2009), scheint also zusätzliche Wirkungen von W7 zu umfassen, die nicht direkt die CaMKII α betreffen. Diese Effekte sind vermutlich auf die spezielle Pharmakologie von W7 zurückzuführen, da der Calmodulin-Inhibitor auch Phosphodiesterasen inhibiert (Hidaka, Asano et al. 1981), die durch die Spaltung des *second messengers* cAMP ebenfalls für eine geringe spontane Exozytoserate in Spermien verantwortlich sind (Meyer, Voigt et al. 2012).

Essentiell für die Funktion der CaMKII scheint ihre Bindung an das Gerüstprotein MUPP1 zu sein (Abbildung 6.30), da die kompetitive Verdrängung der CaMKII aus dem endogenen Komplex mit MUPP1 durch einen Überschuss der rekombinant exprimierten MUPP1-Bindungsdomänen (Abbildung 6.32), genauso wie die Inhibition der CaMKII-Aktivität selbst eine Steigerung der spontanen Akrosomreaktionsrate zur Folge hat (Abbildung 6.27). Dabei könnte MUPP1 für die Co-Lokalisation der CaMKII und ihrer Zielstrukturen verantwortlich sein (Krapivinsky, Medina et al. 2004), deren Funktion durch eine Phosphorylierung durch die CaMKII moduliert werden könnte (Schiebler,

Jahn et al. 1986; Benfenati und Valtorta 1993; Leal-Ortiz, Waites et al. 2008; Wayman, Lee et al. 2008). Als Zielstruktur für die Phosphorylierungsaktivität der CaMKII bei der Verhinderung einer frühzeitigen Akrosomreaktion kommen z. B. die Kalium-Kanäle der Slo-Familie in Frage (Chan, Wu et al. 1998), die eine Hyperpolarisation der Spermienplasmamembran bewirken und damit eine vorzeitige Depolarisation verhindern könnten (Santi, Martinez-Lopez et al. 2010; Brenker, Zhou et al. 2014). Auch die Aktivität von Ca_v -Kanälen könnte, wie in Neuronen, durch die CaMKII moduliert werden (Jiang, Lautermilch et al. 2008).

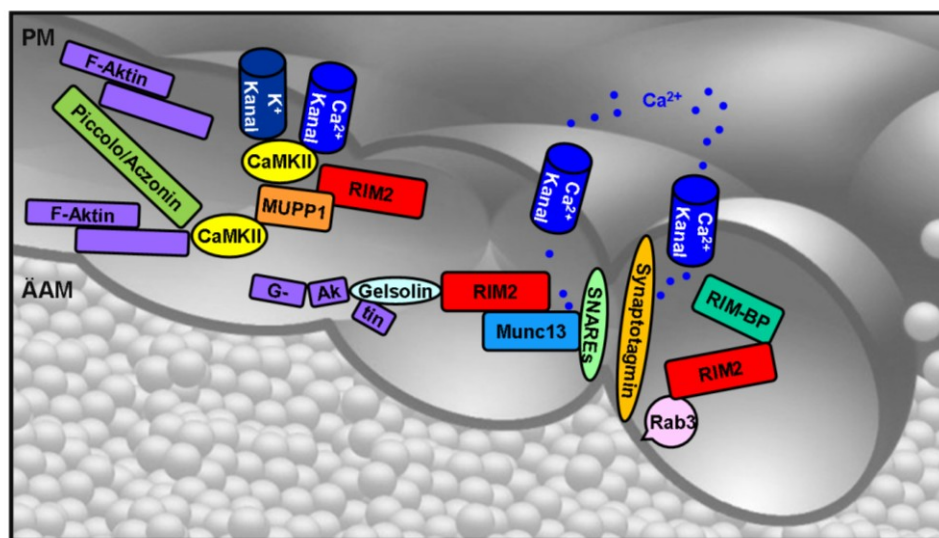


Abbildung 7.2: Potentielles integratives Proteinnetzwerk zur Koordination der multiplen Pseudovesikelbildung während der Akrosomreaktion.

Die verschiedenen, in der vorliegenden Arbeit identifizierten Gerüstproteine könnten die diversen sequentiellen Signalprozesse während der Akrosomreaktion regulieren. Die initiale F-Aktinpolymerisation (violett) zwischen der Plasmamembran (PM) und der äußeren akrosomalen Membran (ÄAM) könnte möglicherweise durch Piccolo/Aczonin (hellgrün) begünstigt werden, wohingegen der spätere Abbau von F-Aktin zu G-Aktin durch Gelsolin (hellblau) im Komplex mit RIM2 (blau) gefördert werden könnte. Die CaMKII (gelb) könnte während der Annäherung der PM und der ÄAM eine frühzeitige Akrosomreaktion verhindern und damit die korrekte Ausbildung der Aktinfilamente und/oder der SNARE-Komplexe (hellgrün) für die präzise „Ausrichtung“ der ÄAM und PM zueinander gewährleisten. Die SNARE-Komplexbildung ist dabei von der *priming*-Funktion eines RIM2-ubMunc13-2-Komplexes (rot-blau) abhängig, dessen Bildung möglicherweise durch initiale, transiente Calcium-Signale reguliert wird. Des Weiteren könnte die korrekte Positionierung von Ca_v -Kanälen (blau) durch RIM2 und RIM-BP3 (grün) eine lokale Erhöhung der Calcium-Konzentration gewährleisten, sodass Synaptotagmin (orange) die eigentliche Fusion vermitteln kann. Eine Ketten-artige Verbindung der einzelnen Proteinkomplexe könnte insgesamt die gerichtete und vollständige Pseudoversikelformung zur großflächigen Freilegung der inneren akrosomalen Membran und damit einer großen Anzahl an Izumo-Molekülen (nicht gezeigt) sicherstellen.

Ein weiteres potentielles Phosphorylierungsziel der CaMKII stellt zudem das RIM2-Protein selbst dar, das an benachbarte PDZ-Domänen von MUPP1 binden kann (Abbildung 6.33) und zudem eine Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch die CaMKII besitzt (Sun, Bittner et al. 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Phosphorylierung von rekombinantem RIM1-Protein durch die CaMKII die Bindungsaffinität für seinen Interaktionspartner 14-3-3 η verbessern kann (Sun, Bittner et al. 2003). Eine andere Isoform von 14-3-3, das 14-3-3 ζ -Protein, ist in bovinen Spermien in der postakrosomalen Region und dem Hauptstück des Spermenschwanzes exprimiert (Huang, Myers et al. 2004). Dort scheint es u. a. dafür

verantwortlich zu sein, dass die Phosphatase PP1 γ 2 in ihrem phosphorylierten, inaktiven Zustand verbleibt, was für die Motilität der Spermien wichtig ist (Huang, Myers et al. 2004). Andererseits wurde auch das *Zona pellucida-binding protein* als Bindungspartner von 14-3-3 identifiziert (Puri, Myers et al. 2008), sodass eine mögliche Funktion von 14-3-3 bei der Erkennung der *Zona pellucida* und/oder der Akrosomreaktion ebenfalls denkbar wäre. Ob MUPP1 aber tatsächlich die physische Nähe zwischen CaMKII und RIM2 in Spermien herstellt und ob die CaMKII endogenes RIM2 phosphorylieren kann und dieses dann mit der in Spermien exprimierten 14-3-3 ζ -Isoform interagiert (Huang, Myers et al. 2004), müsste in weiterführenden Studien überprüft werden. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass ein Antikörper, der einen Teilbereich der Region erkennt, die für die Bindung von RIM2 an MUPP1 verantwortlich ist, die initialen Prozesse der Calcium-abhängigen akrosomalen Exozytose in Mausspermien inhibiert (Ackermann, Zitanski et al. 2008).

7.1.6 *Membrane rafts* als Organisationsprinzip für die Akrosomreaktion

Die in Abbildung 7.1 und 7.2 zusammengefassten Interaktionen könnten die präzise Umsetzung der unterschiedlichen intrazellulären Signalwege in die einzelnen zellulären Prozesse während der Kapazitation und der Akrosomreaktion gewährleisten (Breitbart 2003; Tulsiani, Zeng et al. 2007; Florman, Jungnickel et al. 2008). Daneben scheint ein weiteres räumliches Organisationsprinzip die verschiedenen beteiligten Komponenten so zu koordinieren, dass deren Funktionen in ein gemeinsames Zusammenspiel integriert werden: die *membrane rafts*. Interessanterweise konzentrieren *membrane rafts* Signalmoleküle und Effektoren der verschiedensten Abschnitte der Akrosomreaktion, die vom initialen Arrest während der Kapazitation (CaMKII und MUPP1: Dissertation Frauke Ackermann, 2008), der Erkennung der *Zona pellucida* (Boerke, Tsai et al. 2008; Nixon, Bielanowicz et al. 2009; Kawano, Yoshida et al. 2011), über die intermediären Signalkaskaden (RIM2 und ubMunc13-2: Abbildung 6.11 und 6.17) bis hin zu den Effektoren der multiplen Membranfusion für die Pseudovesikelbildung, den SNARE-Proteinen reichen (Travis, Merdushev et al. 2001; Tsai, De Vries et al. 2007). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Kapazitations-abhängige Umverteilung der *membrane rafts* ein wichtiger Schlüsselprozess für die Akrosomreaktion ist: Die Pseudovesikel, die nach „regulärer“ *in vitro* Kapazitation und Akrosomreaktion elektronenmikroskopisch betrachtet wurden, weisen im Gegensatz zu solchen ohne vorherige Kapazitation der Spermien eine deutlich homogenere Größe und Form auf (Tsai, Brewis et al. 2012). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass die *membrane rafts* analog zu anderen Zellsystemen (Alonso und Millan 2001) Signaltransduktions-Plattformen bilden, die eine uniforme, effiziente Akrosomreaktion gewährleisten (Tsai, Brewis et al. 2012). Die Rekrutierung eines Großteils der an der

Akrosomreaktion beteiligten Komponenten durch eine duale Strategie scheint funktionell besonders geeignet zu sein (Zitranski, Borth et al. 2010). Dabei könnte eine parallele Interaktion der beteiligten Komponenten untereinander (Abbildung 7.1 und 7.2) und deren zusätzliche Assoziation an *membrane rafts* die Basis für die Koordination der molekularen Mechanismen der großflächigen Membranfusion während der Akrosomreaktion bilden (Zitranski, Borth et al. 2010). Diese auf zwei Ordnungsprinzipien beruhende Strategie könnte die vollständige Ablösung der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran, die mit der Pseudovesikelbildung einhergeht, sicherstellen. Dadurch wird dann genügend Izumo-Moleküle auf der inneren akrosomalen Membran freigelegt, sodass durch eine Vielzahl an Izumo-Juno-Bindungen die Befruchtung der Oozyte sichergestellt ist (Bianchi, Doe et al. 2014).

7.2 Das RIM2 α -defiziente Mausmodell: Funktionelle Bedeutung von RIM2 α für die Akrosomreaktion

Wie Abbildung 7.1 verdeutlicht, ist das RIM2-Protein an besonders vielen der Interaktionen des potentiellen CAZ-ähnlichen Proteinnetzwerkes in Spermien beteiligt. Nur die α -Isoform von RIM2 besitzt die vollständige Domänenstruktur zur Interaktion mit Rab3 und ubMunc13-2, die wichtige Bindungspartner von RIM2 α darstellen (s. Abschnitt 7.1.1 und 7.1.2) und deren funktionelle Bedeutung für die Akrosomreaktion gezeigt wurde (Abbildung 6.12; Ward, Faundes et al. 1999; Yunes, Michaut et al. 2000; Bello, Zanetti et al. 2012). Daher wurde der Reproduktionsphänotyp eines RIM2 α -defizienten Mausmodells analysiert (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). RIM2 α -defiziente Mäuse zeugen zwar Nachwuchs, jedoch ist bei Verpaarungen heterozygoter Elterntiere der Prozentsatz homozygot *Rims2 α* -Gen-defizienter Nachkommen im Alter von einem Monat verglichen mit dem nach Mendel'schen Regeln erwarteten Prozentsatz von 25 % (Arndt, Castonguay et al. 2014) signifikant unterrepräsentiert (19,6 %; Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Da die Daten jedoch nicht direkt postnatal, sondern erst nach einem Monat Lebenszeit der Nachkommen erhoben wurden, könnte zusätzlich zu einer reduzierten Anzahl der Nachkommen auch eine geringere Überlebensfähigkeit der RIM2 α -*knockout*-Tiere diesem Phänotyp zugrunde liegen. Mehr Aufschluss über eine Subfertilität von α -RIM-defizienten Männchen gibt eine persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Susanne Schoch (Institut für Neuropathologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn), die die für RIM1 α und RIM2 α defiziente Mauslinie im Labor von Prof. Dr. Thomas Südhof generiert hat. Homozygot RIM1 α und RIM2 α doppelt-defiziente Tiere sind nicht lebensfähig. Allerdings stellt die Anwesenheit nur eines der vier *α Rims*-Allele (RIM1 α +/- RIM2 α -/- oder RIM1 α -/- RIM2 α +/-) die Lebensfähigkeit der Tiere partiell

wieder her (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Von diesen drei-Allel-defizienten Mäusen weisen etwa 50 % der Männchen Defizite in der Reproduktion auf: 20 % dieser drei-Allel-defizienten Tiere zeugen gar keine Nachkommen, während bei weiteren 30 % dieser Verpaarungen verlängerte Perioden zwischen den einzelnen Würfen registriert wurden.

Eine Entwicklungsstörung, die Aberrationen der Morphologie der Spermien und/oder der männlichen Reproduktionsorgane nach sich zieht, wie sie z. B. bei RIM-BP3-defizienten Mäusen beobachtet wurde (Zhou, Du et al. 2009), konnte durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien jedoch als Ursache für eine Subfertilität der RIM2 α -defizienten Tiere ausgeschlossen werden (Abbildung 6.23). Im Gegensatz dazu geben die funktionellen Studien mit inhibitorisch wirkenden anti-RIM Antikörpern einen Hinweis darauf, dass das RIM2-Protein funktionell an der Calcium-vermittelten Akrosomreaktion der Spermien beteiligt ist (Abbildung 6.20C). Aus diesem Grund wurde zunächst die Calcium-induzierte Akrosomreaktionsrate von RIM2 α -defizienten und von Wildtyp-Spermien als Folge der Stimulation mit einem Calcium-Ionophor bestimmt, das einen massiven Influx von Calcium ins Zytosol der Spermien veranlasst (Brucker und Lipford 1995). Diese Studien zeigten jedoch, dass die Deletion des RIM2 α -Proteins bei freier Verfügbarkeit von Calcium die Akrosomreaktion nur marginal beeinträchtigt (Abbildung 6.25A). Die für die Inhibition verwendeten anti-RIM Antikörper erkennen jeweils mehrere RIM-Protein-Isoformen (Abbildung 6.20A), in den untersuchten *knockout*-Tieren ist aber nur die RIM2 α -Isoform deletiert (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006). Daher könnte die geringe Reduktion der Calcium-induzierten Akrosomreaktion in den RIM2 α -defizienten Spermien auf kompensatorische Effekte der residualen RIM2 β - und RIM1 β -Isoformen (Abbildung 6.14 und 6.15) zurückzuführen sein, wie sie auch im neuronalen Zellsystem beobachtet wurde (Schoch, Mittelstaedt et al. 2006).

Im Gegensatz zu dieser möglichen kompensatorischen Wirkung anderer RIM-Protein-Isoformen bei freier Verfügbarkeit von Calcium, kann die funktionelle Rolle von RIM2 α während der *Zona pellucida*-stimulierten Akrosomreaktion nicht durch andere RIM-Subtypen übernommen werden (Abbildung 6.25B). Der massive Einstrom von Calcium durch ein Calcium-Ionophor ins Zytosol der Spermien (Brucker und Lipford 1995) umgeht die verschiedenen *second messenger*-regulierten Signalwege (Darszon, Nishigaki et al. 2011; Abbildung 3.4), die zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den Spermien führen (Arnoult, Kazam et al. 1999; Breitbart 2002; Rahman, Kwon et al. 2014). Ebenso werden die Mechanismen, die für die präzise Positionierung des Calcium-Einstroms in die direkte Nähe zu den Calcium-Effektoren, wie z. B. Synaptotagmin, verantwortlich sind, umgangen (Kirkman-Brown, Punt et al. 2002; Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009; Kaeser, Deng et al. 2011). Dies zeigen insbesondere kürzlich publizierte *live cell imaging* Studien, in denen beobachtet wurde, dass die Akrosomreaktion, sofern Calcium *ad libitum* verfügbar ist, an

randomisierten Positionen des Akrosoms initiiert wird (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009). Im Gegensatz dazu führt die Stimulation mit *Zona pellucida*, die physiologische Bedingungen imitiert, zu einer gerichteten Fusionsporenbildung während der akrosomalen Exozytose (Buffone, Rodriguez-Miranda et al. 2009). Diese präzise räumliche Abfolge der Akrosomreaktion, wie sie nach *Zona pellucida*-Stimulation abläuft, erfordert offensichtlich die Anwesenheit des RIM2 α -Proteins. Da hingegen die freie Verfügbarkeit von Calcium in der Spermienzelle das Fehlen des RIM2 α -Proteins kompensieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass RIM2 α für die Rekrutierung der Calcium-Kanäle in die räumliche Nähe der Calcium-Sensorproteine essentiell ist. Dabei wäre denkbar, dass diese Koordination sowohl die Calcium- und Calcium/Calmodulin-regulierte, sequentielle *priming*-Funktion der *ubMunc13-2*-Proteine (s. Abschnitt 7.1) als auch die lokale Calcium-Konzentration für den finalen Fusionsimpuls durch Synaptotagmin optimiert (Abbildung 7.2).

7.3 Ausblick

Wie in Abbildung 7.1 und Abbildung 7.2 deutlich wird, könnte das in der vorliegenden Arbeit in Nagerspermien identifizierte und funktionell charakterisierte RIM2 α -Protein ein zentrales Element eines potentiellen Proteinnetzwerkes sein, das die verschiedenen, während der Akrosomreaktion teils parallel, teils sequentiell ablaufenden Einzelprozesse integriert. Dadurch könnte eine erfolgreiche Koordination der multiplen Fusionsporenbildung gewährleistet werden. Für ein RIM2 α -basiertes Netzwerk in Spermien konnten in der vorliegenden Arbeit erste Hinweise gesammelt werden. Ob ein solches Netzwerk aber die Exposition von Izumo auf der Spermienoberfläche in Folge der Akrosomreaktion beeinflusst und ob dies Auswirkungen auf den Befruchtungserfolg hat, sind Fragestellungen, denen in zukünftigen *live cell imaging* Studien an RIM2 α -defizienten Spermien, die zusätzlich das Fluoreszenzprotein GFP im Akrosom exprimieren (Nakanishi, Ikawa et al. 1999), nachgegangen werden sollte.

8 Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and P. Borst (1972). "The gel electrophoresis of DNA." *Biochim Biophys Acta* **269**(2): 192-200.
- Ackermann, F., N. Ziturski, et al. (2009). "CaMKII α interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis." *J Cell Sci* **122**(Pt 24): 4547-4557.
- Ackermann, F., N. Ziturski, et al. (2008). "The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid raft-associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa." *J Cell Physiol* **214**(3): 757-768.
- Ahmed, M. S. and S. A. Siegelbaum (2009). "Recruitment of N-Type Ca(2+) channels during LTP enhances low release efficacy of hippocampal CA1 perforant path synapses." *Neuron* **63**(3): 372-385.
- Ahnert-Hilger, G., M. F. Bader, et al. (1989). "Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat pheochromocytoma cells (PC12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion." *J Neurochem* **52**(6): 1751-1758.
- Allen, C. A. and D. P. Green (1997). "The mammalian acrosome reaction: gateway to sperm fusion with the oocyte?" *Bioessays* **19**(3): 241-247.
- Alonso, M. A. and J. Millan (2001). "The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes." *J Cell Sci* **114**(Pt 22): 3957-3965.
- Altrock, W. D., S. tom Dieck, et al. (2003). "Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon." *Neuron* **37**(5): 787-800.
- Arndt, L., J. Castonguay, et al. (2014). "NAADP and the two-pore channel protein 1 participate in the acrosome reaction in mammalian spermatozoa." *Mol Biol Cell* **25**(6): 948-964.
- Arnoult, C., R. A. Cardullo, et al. (1996). "Activation of mouse sperm T-type Ca2+ channels by adhesion to the egg zona pellucida." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13004-13009.
- Arnoult, C., I. G. Kazam, et al. (1999). "Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6757-6762.
- Arnoult, C., Y. Zeng, et al. (1996). "ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization." *J Cell Biol* **134**(3): 637-645.
- Augustin, I., A. Betz, et al. (1999). "Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain." *Biochem J* **337** (Pt 3): 363-371.
- Austin, C. R. (1952). "The capacitation of the mammalian sperm." *Nature* **170**(4321): 326.
- Austin, C. R. (1963). "Acrosome Loss from the Rabbit Spermatozoon in Relation to Entry into the Egg." *J Reprod Fertil* **6**: 313-314.
- Bachelorarbeit Franziska Henze, 2011: Regulierung der Exozytose in Säugerspermien durch die Familie der Rab3 interacting molecules (RIM)-binding proteins (RIM-BP).
- Bahat, A., S. R. Caplan, et al. (2012). "Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range." *PLoS One* **7**(7): e41915.
- Baines, A. J. (2009). "Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 4): 796-803.
- Baker, M. A., G. Reeves, et al. (2007). "Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis." *Proteomics Clin Appl* **1**(5): 524-532.
- Baker, T. A. and S. H. Wickner (1992). "Genetics and enzymology of DNA replication in Escherichia coli." *Annu Rev Genet* **26**: 447-477.
- Bar, H., S. V. Strelkov, et al. (2004). "The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?" *J Struct Biol* **148**(2): 137-152.
- Barrett, B., P. A. Wood, et al. (1960). "Quantitation of gamma globulins in human serum by immunoprecipitation." *J Lab Clin Med* **55**: 605-615.
- Barros, C., J. M. Bedford, et al. (1967). "Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction." *J Cell Biol* **34**(3): C1-5.
- Basu, J., N. Shen, et al. (2005). "A minimal domain responsible for Munc13 activity." *Nat Struct Mol Biol* **12**(11): 1017-1018.
- Baumgart, S., F. Jansen, et al. (2014). "Scaffolding by MUPP1 regulates odorant-mediated signaling in olfactory sensory neurons." *J Cell Sci*.
- Bedford, J. M. (1970). "Sperm capacitation and fertilization in mammals." *Biol Reprod Suppl* **2**: 128-158.
- Bello, O. D., M. N. Zanetti, et al. (2012). "RIM, Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis." *Exp Cell Res* **318**(5): 478-488.
- Benfenati, F. and F. Valtorta (1993). "Protein phosphorylation in the nerve terminal." *Neurochem Int* **23**(1): 27-34.
- Berkefeld, H., B. Fakler, et al. (2010). "Ca2+-activated K+ channels: from protein complexes to function." *Physiol Rev* **90**(4): 1437-1459.
- Betz, A., M. Okamoto, et al. (1997). "Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin." *J Biol Chem* **272**(4): 2520-2526.

- Betz, A., P. Thakur, et al. (2001). "Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming." *Neuron* **30**(1): 183-196.
- Bhakdi, S., J. Tranum-Jensen, et al. (1985). "Mechanism of membrane damage by streptolysin-O." *Infect Immun* **47**(1): 52-60.
- Bhakdi, S., U. Weller, et al. (1993). "A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes." *Med Microbiol Immunol* **182**(4): 167-175.
- Bianchi, E., B. Doe, et al. (2014). "Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization." *Nature* **508**(7497): 483-487.
- Bock, J. B., H. T. Matern, et al. (2001). "A genomic perspective on membrane compartment organization." *Nature* **409**(6822): 839-841.
- Boerke, A., P. S. Tsai, et al. (2008). "Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction." *Theriogenology*.
- Bou Khalil, M., K. Chakrabandhu, et al. (2006). "Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid." *Dev Biol* **290**(1): 220-235.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Branham, M. T., M. A. Bustos, et al. (2009). "Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis." *J Biol Chem* **284**(37): 24825-24839.
- Branham, M. T., L. S. Mayorga, et al. (2006). "Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway." *J Biol Chem* **281**(13): 8656-8666.
- Bray, D. (1998). "Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 59-75.
- Breitbart, H. (2002). "Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis." *J Reprod Immunol* **53**(1-2): 151-159.
- Breitbart, H. (2003). "Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**(3): 321-327.
- Brener, E., S. Rubinstein, et al. (2003). "Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction." *Biol Reprod* **68**(3): 837-845.
- Brenker, C., N. Goodwin, et al. (2012). "The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm." *EMBO J* **31**(7): 1654-1665.
- Brenker, C., Y. Zhou, et al. (2014). "The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3." *Elife* **3**: e01438.
- Brewis, I. A., H. D. Moore, et al. (2005). "Molecular mechanisms during sperm capacitation." *Hum Fertil (Camb)* **8**(4): 253-261.
- Brose, N., K. Hofmann, et al. (1995). "Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins." *J Biol Chem* **270**(42): 25273-25280.
- Brucker, C. and G. B. Lipford (1995). "The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update." *Hum Reprod Update* **1**(1): 51-62.
- Brugnon, F., H. Pons-Rejraji, et al. (2012). "The limits for detection of activated caspases of spermatozoa by western blot in human semen." *Andrologia* **44**(4): 265-272.
- Buck, J., M. L. Sinclair, et al. (1999). "Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 79-84.
- Buell, G. N., M. P. Wickens, et al. (1978). "Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs." *J Biol Chem* **253**(7): 2471-2482.
- Buffone, M. G., N. Hirohashi, et al. (2014). "Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis." *Biol Reprod*.
- Buffone, M. G., T. W. Ijiri, et al. (2012). "Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility." *Mol Reprod Dev* **79**(1): 4-18.
- Buffone, M. G., E. Rodriguez-Miranda, et al. (2009). "Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida." *J Cell Physiol* **220**(3): 611-620.
- Burgess, T. L. and R. B. Kelly (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 243-293.
- Burkhardt, P., D. A. Hattendorf, et al. (2008). "Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide." *EMBO J* **27**(7): 923-933.
- Burstein, E. S., W. H. Brondyk, et al. (1993). "Regulation of the GTPase cycle of the neuronally expressed Ras-like GTP-binding protein Rab3A." *J Biol Chem* **268**(30): 22247-22250.
- Bustos, M. A., O. Lucchesi, et al. (2012). "Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(30): E2057-2066.
- Calakos, N., S. Schoch, et al. (2004). "Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release." *Neuron* **42**(6): 889-896.
- Calvano, C. D., C. De Ceglie, et al. (2014). "Proteomic analysis of complex protein samples by MALDI-TOF mass spectrometry." *Methods Mol Biol* **1129**: 365-380.
- Carlin, R. K., D. J. Grab, et al. (1980). "Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities." *J Cell Biol* **86**(3): 831-845.
- Carreau, S., S. Lambard, et al. (2007). "RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 3): 634-636.
- Cases-Langhoff, C., B. Voss, et al. (1996). "Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix." *Eur J Cell Biol* **69**(3): 214-223.
- Castanon, M. J., G. Walko, et al. (2013). "Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve." *Histochem Cell Biol* **140**(1): 33-53.
- Castillo, P. E., R. Janz, et al. (1997). "Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **388**(6642): 590-593.

- Castillo, P. E., S. Schoch, et al. (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." *Nature* **415**(6869): 327-330.
- Castillo, P. E., M. G. Weisskopf, et al. (1994). "The role of Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation." *Neuron* **12**(2): 261-269.
- Chamberlain, L. H., R. D. Burgoyne, et al. (2001). "SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5619-5624.
- Chan, H. C., W. L. Wu, et al. (1998). "Expression of sperm Ca²⁺-activated K⁺ channels in *Xenopus* oocytes and their modulation by extracellular ATP." *FEBS Lett* **438**(3): 177-182.
- Chan, H. C., T. S. Zhou, et al. (1997). "Cation and anion channels in rat and human spermatozoa." *Biochim Biophys Acta* **1323**(1): 117-129.
- Chen, Y., M. J. Cann, et al. (2000). "Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor." *Science* **289**(5479): 625-628.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk (2012). "The blood-testis barrier and its implications for male contraception." *Pharmacol Rev* **64**(1): 16-64.
- Chin, D. and A. R. Means (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." *Trends Cell Biol* **10**(8): 322-328.
- Chiu, P. C., K. K. Lam, et al. (2014). "The identity of zona pellucida receptor on spermatozoa: An unresolved issue in developmental biology." *Semin Cell Dev Biol* **30C**: 86-95.
- Clapham, D. E. (2013). "Sperm BerserKers." *Elife* **2**: e01469.
- Colbran, R. J. (2004). "Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity." *J Neurosci* **24**(39): 8404-8409.
- Costello, S., F. Michelangeli, et al. (2009). "Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions." *Reproduction* **138**(3): 425-437.
- Cottrell, J. S. (1994). "Protein identification by peptide mass fingerprinting." *Pept Res* **7**(3): 115-124.
- Cross, N. L. (2004). "Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm." *Biol Reprod* **71**(4): 1367-1373.
- Darszon, A., P. Lopez-Martinez, et al. (2006). "T-type Ca²⁺ channels in sperm function." *Cell Calcium* **40**(2): 241-252.
- Darszon, A., T. Nishigaki, et al. (2011). "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa." *Physiol Rev* **91**(4): 1305-1355.
- Dascher, C. and W. E. Balch (1996). "Mammalian Sly1 regulates syntaxin 5 function in endoplasmic reticulum to Golgi transport." *J Biol Chem* **271**(27): 15866-15869.
- Davis, A. F., J. Bai, et al. (1999). "Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes." *Neuron* **24**(2): 363-376.
- Davydova, D., C. Marini, et al. (2014). "Bassoon Specifically Controls Presynaptic P/Q-type Ca(2+) Channels via RIM-Binding Protein." *Neuron* **82**(1): 181-194.
- De Blas, G., M. Michaut, et al. (2002). "The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis." *J Biol Chem* **277**(51): 49326-49331.
- De Blas, G. A., C. M. Roggero, et al. (2005). "Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis." *PLoS Biol* **3**(10): e323.
- de Lamirande, E., P. Leclerc, et al. (1997). "Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization." *Mol Hum Reprod* **3**(3): 175-194.
- Deken, S. L., R. Vincent, et al. (2005). "Redundant localization mechanisms of RIM and ELKS in *Caenorhabditis elegans*." *J Neurosci* **25**(25): 5975-5983.
- Deng, L., P. S. Kaeser, et al. (2011). "RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13." *Neuron* **69**(2): 317-331.
- Derossi, D., A. H. Joliot, et al. (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." *J Biol Chem* **269**(14): 10444-10450.
- Dick, O., S. tom Dieck, et al. (2003). "The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina." *Neuron* **37**(5): 775-786.
- Diplomarbeit Laura Vieweg, 2010: Akrosomale Exocytose in Nagerspermien: Studie zur subzellulären Lokalisation und funktionellen Bedeutung der *priming*-Proteine Munc13.1 und Munc18.1.
- Diplomarbeit Nele Zitanski, 2008: Die Akrosomenreaktion in Nagerspermien: Studie zur Charakterisierung des *Rab3 interacting molecules 2* als potentieller subzellulärer Organisator beteiligter Signalwege.
- Dissertation Frauke Ackermann, 2008: Studien zur Aufklärung des Funktionsmechanismus der Akrosomenreaktion in Spermien: Das Multi-PDZ-Domänen Protein MUPP1 als molekularer Organisator beteiligter Signaltransduktionsmoleküle.
- Dissertation Dorke Meyer, 2013: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Geschmacksrezeptoren in Spermien.
- Drewes, G., A. Ebner, et al. (1997). "MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption." *Cell* **89**(2): 297-308.
- Dulubova, I., X. Lou, et al. (2005). "A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?" *Embo J* **24**(16): 2839-2850.
- Dulubova, I., S. Sugita, et al. (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." *EMBO J* **18**(16): 4372-4382.
- Eisenbach, M. and L. C. Giojalas (2006). "Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(4): 276-285.
- Eisenbach, M. and I. Tur-Kaspa (1999). "Do human eggs attract spermatozoa?" *Bioessays* **21**(3): 203-210.
- El-Maghrabi, M. R., E. Fox, et al. (1982). "Cyclic AMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase, fructose 2,6-bisphosphatase." *Biochem Biophys Res Commun* **106**(3): 794-802.
- Enserink, J. M., A. E. Christensen, et al. (2002). "A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK." *Nat Cell Biol* **4**(11): 901-906.
- Ermolyuk, Y. S., F. G. Alder, et al. (2013). "Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels." *Nat Neurosci* **16**(12): 1754-1763.

- Escoffier, J., I. Jemel, et al. (2010). "Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice." *J Clin Invest* **120**(5): 1415-1428.
- Fasshauer, D., R. B. Sutton, et al. (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15781-15786.
- Fejtova, A. and E. D. Gundelfinger (2006). "Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release." *Results Probl Cell Differ* **43**: 49-68.
- Fenster, S. D., W. J. Chung, et al. (2000). "Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon." *Neuron* **25**(1): 203-214.
- Fenster, S. D., M. M. Kessels, et al. (2003). "Interactions between Piccolo and the actin/dynamin-binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to presynaptic active zones." *J Biol Chem* **278**(22): 20268-20277.
- Flesch, F. M., J. F. Brouwers, et al. (2001). "Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane." *J Cell Sci* **114**(Pt 19): 3543-3555.
- Florman, H. M., M. K. Jungnickel, et al. (2008). "Regulating the acrosome reaction." *Int J Dev Biol* **52**(5-6): 503-510.
- Florman, H. M. and B. T. Storey (1982). "Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro." *Dev Biol* **91**(1): 121-130.
- Florman, H. M., R. M. Tombes, et al. (1989). "An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis." *Dev Biol* **135**(1): 133-146.
- Frank, T., M. A. Rutherford, et al. (2010). "Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca(2)+ channels and vesicles to add release sites and promote refilling." *Neuron* **68**(4): 724-738.
- Friebe, A. and D. Koesling (2009). "The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models." *Nitric Oxide* **21**(3-4): 149-156.
- Fujimoto, K., T. Shibasaki, et al. (2002). "Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2.Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis." *J Biol Chem* **277**(52): 50497-50502.
- Fujiwara, M., T. Uemura, et al. (2014). "Interactomics of Qa-SNARE in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell Physiol* **55**(4): 781-789.
- Fukami, K., K. Nakao, et al. (2001). "Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction." *Science* **292**(5518): 920-923.
- Fukami, K., M. Yoshida, et al. (2003). "Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm." *J Cell Biol* **161**(1): 79-88.
- Fukui, K., T. Sasaki, et al. (1997). "Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins." *J Biol Chem* **272**(8): 4655-4658.
- Gadella, B. M. (2012). "Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation." *Reprod Fertil Dev* **25**(1): 26-37.
- Gadella, B. M. and J. P. Evans (2011). "Membrane fusions during mammalian fertilization." *Adv Exp Med Biol* **713**: 65-80.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." *Biol Reprod* **67**(1): 340-350.
- Gadella, B. M., P. S. Tsai, et al. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." *Int J Dev Biol* **52**(5-6): 473-480.
- Garcia, J., S. H. Gerber, et al. (2004). "A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing." *Nat Struct Mol Biol* **11**(1): 45-53.
- Gerber, S. H., J. Garcia, et al. (2001). "An unusual C(2)-domain in the active-zone protein piccolo: implications for Ca(2+) regulation of neurotransmitter release." *EMBO J* **20**(7): 1605-1619.
- Gerber, S. H., J. C. Rah, et al. (2008). "Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion." *Science* **321**(5895): 1507-1510.
- Gonen, T., P. Donaldson, et al. (2000). "Galectin-3 is associated with the plasma membrane of lens fiber cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(1): 199-203.
- Gonzalez-Fernandez, L., B. Macias-Garcia, et al. (2012). "Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm." *Reproduction* **144**(4): 411-422.
- Gournier, H., H. Stenmark, et al. (1998). "Two distinct effectors of the small GTPase Rab5 cooperate in endocytic membrane fusion." *EMBO J* **17**(7): 1930-1940.
- Griffith, L. C. (2004). "Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions." *J Neurosci* **24**(39): 8394-8398.
- Grube, D. (1980). "Immunoperoxidase methods: increased efficiency using fluorescence microscopy for 3,3'-diaminobenzidine (DAB) stained semithin sections." *Histochemistry* **70**(1): 19-22.
- Guan, R., H. Dai, et al. (2008). "Binding of the Munc13-1 MUN domain to membrane-anchored SNARE complexes." *Biochemistry* **47**(6): 1474-1481.
- Guillaume, J. L., A. M. Daulat, et al. (2008). "The PDZ protein muppl promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor." *J Biol Chem* **283**(24): 16762-16771.
- Gundelfinger, E. D. and A. Fejtova (2012). "Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone." *Curr Opin Neurobiol* **22**(3): 423-430.
- Gupta, S. K., B. Bhandari, et al. (2012). "Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization." *Cell Tissue Res* **349**(3): 665-678.
- Guttman, J. A., D. J. Mulholland, et al. (1999). "Plectin is concentrated at intercellular junctions and at the nuclear surface in morphologically differentiated rat Sertoli cells." *Anat Rec* **254**(3): 418-428.
- Hallermann, S., A. Fejtova, et al. (2010). "Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse." *Neuron* **68**(4): 710-723.
- Hallermann, S., M. Heckmann, et al. (2010). "Mechanisms of short-term plasticity at neuromuscular active zones of Drosophila." *HFSP J* **4**(2): 72-84.

- Hamazaki, Y., M. Itoh, et al. (2002). "Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule." *J Biol Chem* **277**(1): 455-461.
- Han, Y., P. S. Kaeser, et al. (2011). "RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone." *Neuron* **69**(2): 304-316.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Handel, M. A. (1987). "Genetic control of spermatogenesis in mice." *Results Probl Cell Differ* **15**: 1-62.
- Hanson, P. I., J. E. Heuser, et al. (1997). "Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes." *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 310-315.
- Hanson, P. I. and H. Schulman (1992). "Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* **267**(24): 17216-17224.
- Harper, C. V., J. A. Cummmerson, et al. (2008). "Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm." *J Cell Sci* **121**(Pt 13): 2130-2135.
- Hartree, E. F. (1975). "The acrosome-lysosome relationship." *J Reprod Fertil* **44**(1): 125-126.
- Hedgpeth, J., H. M. Goodman, et al. (1972). "DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(11): 3448-3452.
- Herrick, S. B., D. L. Schweissinger, et al. (2005). "The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store." *J Cell Physiol* **202**(3): 663-671.
- Heydecke, D., D. Meyer, et al. (2006). "The Multi PDZ Domain Protein MUPP1 as a Putative Scaffolding Protein for Organizing Signaling Complexes in the Acrosome of Mammalian Spermatozoa." *J Androl* **27**(3): 390-404.
- Hibino, H., R. Pironkova, et al. (2002). "RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels." *Neuron* **34**(3): 411-423.
- Hidaka, H., M. Asano, et al. (1981). "Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives." *Mol Pharmacol* **20**(3): 571-578.
- Hilfiker, S., V. A. Pieribone, et al. (1999). "Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases." *J Neurochem* **73**(3): 921-932.
- Hinkovska-Galcheva, V. and P. N. Srivastava (1993). "Phospholipids of rabbit and bull sperm membranes: structural order parameter and steady-state fluorescence anisotropy of membranes and membrane leaflets." *Mol Reprod Dev* **35**(2): 209-217.
- Hinkovska, V. T., G. P. Dimitrov, et al. (1986). "Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes." *Int J Biochem* **18**(12): 1115-1121.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2003). "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." *Biol Reprod* **68**(5): 1590-1596.
- Hook, S. S. and A. R. Means (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 471-505.
- Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures." *J Histochem Cytochem* **29**(4): 577-580.
- Huang, Y. Y., S. S. Zakharenko, et al. (2005). "Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9365-9370.
- Huang, Z., K. Myers, et al. (2004). "Protein 14-3-3zeta binds to protein phosphatase PP1gamma2 in bovine epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* **71**(1): 177-184.
- Huber, A. (2001). "Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction." *Eur J Neurosci* **14**(5): 769-776.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function." *Annu Rev Biochem* **71**: 473-510.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Structure-function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II." *Biochem J* **364**(Pt 3): 593-611.
- Hung, P. H. and S. S. Suarez (2010). "Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct." *Soc Reprod Fertil Suppl* **67**: 257-266.
- Hunter, T. and H. Schulman (2005). "CaMKII structure-an elegant design." *Cell* **123**(5): 765-767.
- Hutt, D. M., J. M. Baltz, et al. (2005). "Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction." *J Biol Chem* **280**(21): 20197-20203.
- Ickowicz, D., M. Finkelstein, et al. (2012). "Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases." *Asian J Androl* **14**(6): 816-821.
- Ignatz, G. G. and S. S. Suarez (2005). "Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm." *Biol Reprod* **73**(3): 519-526.
- Iida, H., Y. Yoshinaga, et al. (1999). "Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm." *Dev Biol* **211**(1): 144-155.
- Inaba, K. (2003). "Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling." *Zoolog Sci* **20**(9): 1043-1056.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.
- Ishida, A., Y. Shigeri, et al. (1998). "Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II." *FEBS Lett* **427**(1): 115-118.
- Jacobo, S. M., M. L. Guerra, et al. (2009). "The intracellular II-III loops of Cav1.2 and Cav1.3 uncouple L-type voltage-gated Ca2+ channels from glucagon-like peptide-1 potentiation of insulin secretion in INS-1 cells via displacement from lipid rafts." *J Pharmacol Exp Ther* **330**(1): 283-293.
- Jahn, R. (2004). "Principles of exocytosis and membrane fusion." *Ann N Y Acad Sci* **1014**: 170-178.
- Jahn, R. and D. Fasshauer (2012). "Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles." *Nature* **490**(7419): 201-207.

- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs-engines for membrane fusion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 631-643.
- James, P., M. Quadroni, et al. (1993). "Protein identification by mass profile fingerprinting." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 58-64.
- Jha, K. N., D. B. Kameshwari, et al. (2003). "Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**(3): 329-340.
- Jiang, X., N. J. Lautermilch, et al. (2008). "Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 341-346.
- Jin, M., E. Fujiwara, et al. (2011). "Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 4892-4896.
- Jing, Z., M. A. Rutherford, et al. (2013). "Disruption of the presynaptic cytomatrix protein bassoon degrades ribbon anchorage, multiquantal release, and sound encoding at the hair cell afferent synapse." *J Neurosci* **33**(10): 4456-4467.
- Jones, A. T. and E. J. Sayers (2012). "Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs." *J Control Release* **161**(2): 582-591.
- Junge, H. J., J. S. Rhee, et al. (2004). "Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity." *Cell* **118**(3): 389-401.
- Jungnickel, M. K., K. A. Sutton, et al. (2007). "Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction." *Dev Biol* **304**(1): 116-126.
- Kaboord, B. and M. Perr (2008). "Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation." *Methods Mol Biol* **424**: 349-364.
- Kaelin, W. G., Jr., D. C. Pallas, et al. (1991). "Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product." *Cell* **64**(3): 521-532.
- Kaesler, P. S. (2011). "Pushing synaptic vesicles over the RIM." *Cell Logist* **1**(3): 106-110.
- Kaesler, P. S., L. Deng, et al. (2009). "ELKS2alpha/CAST deletion selectively increases neurotransmitter release at inhibitory synapses." *Neuron* **64**(2): 227-239.
- Kaesler, P. S., L. Deng, et al. (2012). "RIM genes differentially contribute to organizing presynaptic release sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(29): 11830-11835.
- Kaesler, P. S., L. Deng, et al. (2011). "RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction." *Cell* **144**(2): 282-295.
- Kaesler, P. S., H. B. Kwon, et al. (2008). "RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14680-14685.
- Kaesler, P. S., H. B. Kwon, et al. (2008). "RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions." *J Neurosci* **28**(50): 13435-13447.
- Kaiser, P., D. Meierhofer, et al. (2008). "Tandem affinity purification combined with mass spectrometry to identify components of protein complexes." *Methods Mol Biol* **439**: 309-326.
- Kang, G., J. W. Joseph, et al. (2003). "Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* **278**(10): 8279-8285.
- Kantardzhieva, A., M. Peppi, et al. (2012). "Protein composition of immunoprecipitated synaptic ribbons." *J Proteome Res* **11**(2): 1163-1174.
- Katz, B. (1979). "Elementary components of synaptic transmission." *Naturwissenschaften* **66**(12): 606-610.
- Kawano, N., K. Yoshida, et al. (2011). "Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis." *J Lipids* **2011**: 264706.
- Ketema, M., M. Kreft, et al. (2013). "Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis." *Mol Biol Cell* **24**(15): 2454-2466.
- Khanna, R., Q. Li, et al. (2006). "N type Ca²⁺ channels and RIM scaffold protein covary at the presynaptic transmitter release face but are components of independent protein complexes." *Neuroscience* **140**(4): 1201-1208.
- Khimich, D., R. Nouvian, et al. (2005). "Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling." *Nature* **434**(7035): 889-894.
- Kierszenbaum, A. L. (2000). "Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs." *Mol Reprod Dev* **57**(4): 309-310.
- Kierszenbaum, A. L., E. Rivkin, et al. (2007). "Molecular biology of sperm head shaping." *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**: 33-43.
- Kim, S., J. Ko, et al. (2003). "The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo." *J Biol Chem* **278**(8): 6291-6300.
- Kirichok, Y., B. Navarro, et al. (2006). "Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel." *Nature* **439**(7077): 737-740.
- Kirkman-Brown, J. C., E. L. Punt, et al. (2002). "Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa." *J Androl* **23**(3): 306-315.
- Kitamura, K., H. Tanaka, et al. (2003). "Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction." *J Biol Chem* **278**(45): 44417-44423.
- Kittel, R. J., C. Wichmann, et al. (2006). "Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release." *Science* **312**(5776): 1051-1054.
- Kiyonaka, S., H. Nakajima, et al. (2012). "Physical and functional interaction of the active zone protein CAST/ERC2 and the beta-subunit of the voltage-dependent Ca(2+) channel." *J Biochem* **152**(2): 149-159.
- Klemm, M. and W. Engel (1991). "On the capacity of mouse spermatozoa for spontaneous acrosome reaction in the male and female genital tract." *Andrologia* **23**(6): 427-433.

- Kloepper, T. H., C. N. Kienle, et al. (2007). "An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system." *Mol Biol Cell* **18**(9): 3463-3471.
- Koch, H., K. Hofmann, et al. (2000). "Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform." *Biochem J* **349**(Pt 1): 247-253.
- Krajewska, W. M. and I. Maslowska (2004). "Caveolins: structure and function in signal transduction." *Cell Mol Biol Lett* **9**(2): 195-220.
- Krapivinsky, G., I. Medina, et al. (2004). "SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation." *Neuron* **43**(4): 563-574.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lang, T. (2007). "SNARE proteins and 'membrane rafts'." *J Physiol* **585**(Pt 3): 693-698.
- Le Pecq, J. B. and C. Paoletti (1966). "A new fluorometric method for RNA and DNA determination." *Anal Biochem* **17**(1): 100-107.
- Leal-Ortiz, S., C. L. Waites, et al. (2008). "Piccolo modulation of Synapsin1a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis." *J Cell Biol* **181**(5): 831-846.
- Lee, H. K., Y. Yang, et al. (2010). "Dynamic Ca²⁺-dependent stimulation of vesicle fusion by membrane-anchored synaptotagmin 1." *Science* **328**(5979): 760-763.
- Lehman, I. R. (1974). "DNA ligase: structure, mechanism, and function." *Science* **186**(4166): 790-797.
- Li, K. W., M. P. Hornshaw, et al. (2004). "Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology." *J Biol Chem* **279**(2): 987-1002.
- Li, L. and L. S. Chin (2003). "The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis." *Cell Mol Life Sci* **60**(5): 942-960.
- Liew, C. W., M. Vockel, et al. (2009). "Interaction of the human somatostatin receptor 3 with the multiple PDZ domain protein MUPP1 enables somatostatin to control permeability of epithelial tight junctions." *FEBS Lett* **583**(1): 49-54.
- Limbach, C., M. M. Laue, et al. (2011). "Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(31): E392-401.
- Linderoth, N. A., P. Model, et al. (1996). "Essential role of a sodium dodecyl sulfate-resistant protein IV multimer in assembly-export of filamentous phage." *J Bacteriol* **178**(7): 1962-1970.
- Lishko, P. V., Y. Kirichok, et al. (2012). "The control of male fertility by spermatozoan ion channels." *Annu Rev Physiol* **74**: 453-475.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (1996). "Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding." *Fertil Steril* **66**(2): 312-315.
- Liu, Y., D. K. Wang, et al. (2012). "The physiology of bicarbonate transporters in mammalian reproduction." *Biol Reprod* **86**(4): 99.
- Lopez-Gonzalez, I., P. Torres-Rodriguez, et al. (2014). "Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation." *Mol Hum Reprod*.
- Lopez, C. I., S. A. Belmonte, et al. (2007). "Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm." *Faseb J*.
- Lu, H. Y., J. C. Lu, et al. (2002). "[Detection of human sperm morphology and acrosome reaction with Coomassie brilliant blue staining]." *Zhonghua Nan Ke Xue* **8**(3): 204-206.
- Lu, J., M. Machius, et al. (2006). "Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch." *PLoS Biol* **4**(7): e192.
- Luconi, M., G. Forti, et al. (2006). "Pathophysiology of sperm motility." *Front Biosci* **11**: 1433-1447.
- Luebke, J. I., K. Dunlap, et al. (1993). "Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus." *Neuron* **11**(5): 895-902.
- Lynn, B. D., X. Li, et al. (2012). "Under construction: building the macromolecular superstructure and signaling components of an electrical synapse." *J Membr Biol* **245**(5-6): 303-317.
- Ma, C., W. Li, et al. (2011). "Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex." *Nat Struct Mol Biol* **18**(5): 542-549.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." *J Mol Biol* **53**(1): 159-162.
- Mannowetz, N., N. M. Naidoo, et al. (2013). "Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa." *Elife* **2**: e01009.
- Mannowetz, N., P. M. Wandernoth, et al. (2012). "Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation." *PLoS One* **7**(7): e41030.
- Margittai, M., J. Widengren, et al. (2003). "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15516-15521.
- Martinez-Heredia, J., J. M. Estanyol, et al. (2006). "Proteomic identification of human sperm proteins." *Proteomics* **6**(15): 4356-4369.
- Matsuyama, M., H. Tanaka, et al. (2013). "Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells." *J Biol Chem*.
- Matthews, G., E. Neher, et al. (1989). "Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells." *J Physiol* **418**: 105-130.
- Mayorga, L. S., C. N. Tomes, et al. (2007). "Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion." *IUBMB Life* **59**(4): 286-292.
- McKeel, D. W. and L. Jarett (1970). "Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells." *J Cell Biol* **44**(2): 417-432.
- McMahon, H. T. and E. Boucrot (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(8): 517-533.

- Meador, W. E., A. R. Means, et al. (1993). "Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures." *Science* **262**(5140): 1718-1721.
- Mendoza Schulz, A., Z. Jing, et al. (2014). "Bassoon-disruption slows vesicle replenishment and induces homeostatic plasticity at a CNS synapse." *EMBO J* **33**(5): 512-527.
- Meyer, D., A. Voigt, et al. (2012). "Expression of Tas1 taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca(2)(+) and cAMP concentrations in spermatozoa." *PLoS One* **7**(2): e32354.
- Michaut, M., G. De Blas, et al. (2001). "Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa." *Dev Biol* **235**(2): 521-529.
- Michaut, M., C. N. Tomes, et al. (2000). "Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9996-10001.
- Mittelstaedt, T. and S. Schoch (2007). "Structure and evolution of RIM-BP genes: identification of a novel family member." *Gene* **403**(1-2): 70-79.
- Monier, S., F. Jollivet, et al. (2002). "Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport." *Traffic* **3**(4): 289-297.
- Monteiro, A. C., R. Sumagin, et al. (2013). "JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function." *Mol Biol Cell* **24**(18): 2849-2860.
- Mukherjee, K., X. Yang, et al. (2010). "Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(14): 6504-6509.
- Munro, S. (2003). "Lipid rafts: elusive or illusive?" *Cell* **115**(4): 377-388.
- Nakanishi, T., M. Ikawa, et al. (1999). "Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein." *FEBS Lett* **449**(2-3): 277-283.
- Nakano, M., Y. Tanaka, et al. (1989). "Boar acrosin digestion of the porcine egg coat, zona pellucida, and rearrangement of the zona proteins." *J Biochem* **105**(1): 138-142.
- Neely, A. and P. Hidalgo (2014). "Structure-function of proteins interacting with the alpha pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels." *Front Physiol* **5**: 209.
- Neher, E. and T. Sakaba (2008). "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release." *Neuron* **59**(6): 861-872.
- Nixon, B., R. J. Aitken, et al. (2007). "New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction." *Cell Mol Life Sci* **64**(14): 1805-1823.
- Nixon, B., A. Bielanicz, et al. (2009). "Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa." *J Cell Physiol* **218**(1): 122-134.
- O'Toole, C. M., C. Arnoult, et al. (2000). "Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction." *Mol Biol Cell* **11**(5): 1571-1584.
- Ohtsuka, T., E. Takao-Rikitsu, et al. (2002). "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1." *J Cell Biol* **158**(3): 577-590.
- Oishi, M. and S. D. Cosloy (1972). "The genetic and biochemical basis of the transformability of Escherichia coli K12." *Biochem Biophys Res Commun* **49**(6): 1568-1572.
- Okabe, M. and J. M. Cummins (2007). "Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals." *Cell Mol Life Sci* **64**(15): 1945-1958.
- Oliva, R., S. de Mateo, et al. (2009). "Sperm cell proteomics." *Proteomics* **9**(4): 1004-1017.
- Ostrom, R. S. and X. Liu (2007). "Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae." *Methods Mol Biol* **400**: 459-468.
- Ozaki, N., T. Shibasaki, et al. (2000). "cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis." *Nat Cell Biol* **2**(11): 805-811.
- Papadopoulos, A., V. M. Tomatis, et al. (2013). "The Cortical Acto-Myosin Network: From Diffusion Barrier to Functional Gateway in the Transport of Neurosecretory Vesicles to the Plasma Membrane." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 153.
- Parker, L. L., J. R. Backstrom, et al. (2003). "Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT2C receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1." *J Biol Chem* **278**(24): 21576-21583.
- Parks, J. E., J. W. Arion, et al. (1987). "Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa." *Biol Reprod* **37**(5): 1249-1258.
- Pearse, B. M. (1976). "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4): 1255-1259.
- Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." *J Lipid Res* **47**(7): 1597-1598.
- Pobbati, A. V., A. Stein, et al. (2006). "N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion." *Science* **313**(5787): 673-676.
- Poncer, J. C., R. A. McKinney, et al. (1997). "Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses." *Neuron* **18**(3): 463-472.
- Puri, P., K. Myers, et al. (2008). "Proteomic analysis of bovine sperm YWHA binding partners identify proteins involved in signaling and metabolism." *Biol Reprod* **79**(6): 1183-1191.
- Rahman, M. S., W. S. Kwon, et al. (2014). "Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update." *Biomed Res Int* **2014**: 841615.
- Rahman, M. S., J. S. Lee, et al. (2013). "Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception." *Int J Endocrinol* **2013**: 360986.
- Ren, D., B. Navarro, et al. (2001). "A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility." *Nature* **413**(6856): 603-609.
- Ren, D. and J. Xia (2010). "Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization." *Physiology (Bethesda)* **25**(3): 165-175.
- Rhee, J. S., A. Betz, et al. (2002). "Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs." *Cell* **108**(1): 121-133.

- Rice, E. W. and P. A. Hammer (1969). "Improved solution technic for spectrophotometry of Ponceau S-stained cellulose acetate electrophoretograms." *Tech Bull Regist Med Technol* **39**(1): 17-18.
- Richmond, J. E., R. M. Weimer, et al. (2001). "An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming." *Nature* **412**(6844): 338-341.
- Rizo, J., X. Chen, et al. (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release." *Trends Cell Biol* **16**(7): 339-350.
- Rodriguez-Martinez, H., E. Ekstedt, et al. (1990). "Acidification of epididymal fluid in the boar." *Int J Androl* **13**(3): 238-243.
- Rodriguez, F., M. N. Zanetti, et al. (2012). "Munc18-1 controls SNARE protein complex assembly during human sperm acrosomal exocytosis." *J Biol Chem* **287**(52): 43825-43839.
- Rotfeld, H., P. Hillman, et al. (2014). "PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade." *Reproduction* **147**(3): 347-356.
- Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." *Nature* **372**(6501): 55-63.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sakaguchi, G., S. Orita, et al. (1998). "A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 846-851.
- Salaun, C., D. J. James, et al. (2004). "Lipid rafts and the regulation of exocytosis." *Traffic* **5**(4): 255-264.
- Salicioni, A. M., M. D. Platt, et al. (2007). "Signalling pathways involved in sperm capacitation." *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**: 245-259.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Santi, C. M., P. Martinez-Lopez, et al. (2010). "The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility." *FEBS Lett* **584**(5): 1041-1046.
- Schiebler, W., R. Jahn, et al. (1986). "Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles." *J Biol Chem* **261**(18): 8383-8390.
- Schoch, S., P. E. Castillo, et al. (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." *Nature* **415**(6869): 321-326.
- Schoch, S. and E. D. Gundelfinger (2006). "Molecular organization of the presynaptic active zone." *Cell Tissue Res* **326**(2): 379-391.
- Schoch, S., T. Mittelstaedt, et al. (2006). "Redundant functions of RIM1alpha and RIM2alpha in Ca(2+)-triggered neurotransmitter release." *Embo J* **25**(24): 5852-5863.
- Sebkova, N., L. Ded, et al. (2014). "Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction." *Reproduction* **147**(2): 231-240.
- Selimi, F., I. M. Cristea, et al. (2009). "Proteomic studies of a single CNS synapse type: the parallel fiber/purkinje cell synapse." *PLoS Biol* **7**(4): e83.
- Sharp, P. A., B. Sugden, et al. (1973). "Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis." *Biochemistry* **12**(16): 3055-3063.
- Shin, O. H., J. Lu, et al. (2010). "Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca2+ regulator of synaptic exocytosis." *Nat Struct Mol Biol* **17**(3): 280-288.
- Shogomori, H. and D. A. Brown (2003). "Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly." *Biol Chem* **384**(9): 1259-1263.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-572.
- Sinowatz, F., J. Plendl, et al. (1998). "Protein-carbohydrate interactions during fertilization." *Acta Anat (Basel)* **161**(1-4): 196-205.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase." *Gene* **67**(1): 31-40.
- Sobrero, A. J. and J. Macleod (1962). "The immediate postcoital test." *Fertil Steril* **13**: 184-189.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, et al. (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* **362**(6418): 318-324.
- Sollner, T. H. and J. E. Rothman (1996). "Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion." *Cell Struct Funct* **21**(5): 407-412.
- Song, K. S., S. Li, et al. (1996). "Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains." *J Biol Chem* **271**(16): 9690-9697.
- Song, Y., M. Ailenberg, et al. (1998). "Cloning of a novel gene in the human kidney homologous to rat munc13s: its potential role in diabetic nephropathy." *Kidney Int* **53**(6): 1689-1695.
- Stein, A., G. Weber, et al. (2009). "Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane." *Nature* **460**(7254): 525-528.
- Stevens, D. R., Z. X. Wu, et al. (2005). "Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1." *Curr Biol* **15**(24): 2243-2248.
- Stossel, T. P., C. Chaponnier, et al. (1985). "Nonmuscle actin-binding proteins." *Annu Rev Cell Biol* **1**: 353-402.
- Suarez, S. S. (2008). "Control of hyperactivation in sperm." *Hum Reprod Update*.
- Suarez, S. S. and A. A. Pacey (2006). "Sperm transport in the female reproductive tract." *Hum Reprod Update* **12**(1): 23-37.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547.
- Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." *Neuron* **75**(1): 11-25.
- Sudhof, T. C. and J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." *Science* **323**(5913): 474-477.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, et al. (1999). "Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein." *J Biol Chem* **274**(47): 33179-33182.
- Sun, L., M. A. Bittner, et al. (2003). "Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N terminus." *J Biol Chem* **278**(40): 38301-38309.

- Surks, H. K., C. T. Richards, et al. (2003). "Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA." *J Biol Chem* **278**(51): 51484-51493.
- Sutovsky, P. (2009). "Sperm-egg adhesion and fusion in mammals." *Expert Rev Mol Med* **11**: e11.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, et al. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." *Nature* **395**(6700): 347-353.
- Takao-Rikitsu, E., S. Mochida, et al. (2004). "Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release." *J Cell Biol* **164**(2): 301-311.
- Tanihara, F., M. Nakai, et al. (2014). "Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor 'IZUMO' during in vitro fertilization in pigs." *Anim Sci J* **85**(4): 395-404.
- Tanphaichitr, N., E. Carmona, et al. (2007). "New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts." *Front Biosci* **12**: 1748-1766.
- Tao-Cheng, J. H., A. Dosemeci, et al. (2006). "Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization." *Brain Cell Biol* **35**(2-3): 117-124.
- Thaler, C. D., M. Thomas, et al. (2006). "Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation." *Mol Reprod Dev* **73**(12): 1541-1549.
- Thomazeau, A., O. Lassalle, et al. (2014). "Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene *dyrk1a*." *J Neurosci* **34**(4): 1138-1147.
- tom Dieck, S., W. D. Altmann, et al. (2005). "Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex." *J Cell Biol* **168**(5): 825-836.
- tom Dieck, S., L. Sanmarti-Vila, et al. (1998). "Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals." *J Cell Biol* **142**(2): 499-509.
- Tomes, C. N. (2007). "Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis." *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**: 275-291.
- Tomes, C. N., G. A. De Blas, et al. (2005). "alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction." *Mol Hum Reprod* **11**(1): 43-51.
- Tomes, C. N., M. Michaut, et al. (2002). "SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction." *Dev Biol* **243**(2): 326-338.
- Toonen, R. F. and M. Verhage (2007). "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control." *Trends Neurosci* **30**(11): 564-572.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Tranter, R., J. A. Read, et al. (2000). "Effector sites in the three-dimensional structure of mammalian sperm beta-acrosin." *Structure* **8**(11): 1179-1188.
- Travis, A. J., T. Merdushev, et al. (2001). "Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa." *Dev Biol* **240**(2): 599-610.
- Tsai, P. S., I. A. Brewis, et al. (2012). "Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis." *PLoS One* **7**(3): e32603.
- Tsai, P. S., K. J. De Vries, et al. (2007). "Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells." *Mol Membr Biol* **24**(4): 313-324.
- Tsai, P. S., N. Garcia-Gil, et al. (2010). "How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane." *PLoS One* **5**(6): e11204.
- Tsetsenis, T., T. J. Younts, et al. (2011). "Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14300-14305.
- Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, et al. (2002). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." *Trends Neurosci* **25**(8): 412-417.
- Tulsiani, D. R. and A. Abou-Haila (2004). "Is sperm capacitation analogous to early phases of Ca²⁺-triggered membrane fusion in somatic cells and viruses?" *Bioessays* **26**(3): 281-290.
- Tulsiani, D. R., A. Abou-Haila, et al. (1998). "The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization." *Exp Cell Res* **240**(2): 151-164.
- Tulsiani, D. R., H. T. Zeng, et al. (2007). "Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways." *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**: 257-272.
- Ullmer, C., K. Schmuck, et al. (1998). "Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein." *FEBS Lett* **424**(1-2): 63-68.
- Uriu, Y., S. Kiyonaka, et al. (2010). "Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* **285**(28): 21750-21767.
- van Gestel, R. A., I. A. Brewis, et al. (2007). "Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte." *Mol Hum Reprod* **13**(7): 445-454.
- van Gestel, R. A., I. A. Brewis, et al. (2005). "Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells." *Mol Hum Reprod* **11**(8): 583-590.
- Varoqueaux, F., M. S. Sons, et al. (2005). "Aberrant morphology and residual transmitter release at the Munc13-deficient mouse neuromuscular synapse." *Mol Cell Biol* **25**(14): 5973-5984.
- Verhage, M. and J. B. Sorensen (2008). "Vesicle Docking in Regulated Exocytosis." *Traffic*.
- Visconti, P. E. (2009). "Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(3): 667-668.
- Vjugina, U. and J. P. Evans (2008). "New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions." *Front Biosci* **13**: 462-476.
- Wagh, D. A., T. M. Rasse, et al. (2006). "Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*." *Neuron* **49**(6): 833-844.
- Waites, C. L., S. A. Leal-Ortiz, et al. (2011). "Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin." *J Neurosci* **31**(40): 14250-14263.

- Waites, C. L., S. A. Leal-Ortiz, et al. (2013). "Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation." *EMBO J* **32**(7): 954-969.
- Walensky, L. D. and S. H. Snyder (1995). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm." *J Cell Biol* **130**(4): 857-869.
- Walev, I., S. C. Bhakdi, et al. (2001). "Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3185-3190.
- Wang, X., B. Hu, et al. (2009). "A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1." *J Neurosci* **29**(40): 12584-12596.
- Wang, X., M. Kibschull, et al. (1999). "Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin." *J Cell Biol* **147**(1): 151-162.
- Wang, Y., X. Liu, et al. (2002). "A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14464-14469.
- Wang, Y., M. Okamoto, et al. (1997). "Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion." *Nature* **388**(6642): 593-598.
- Wang, Y. and T. C. Sudhof (2003). "Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins (small star, filled)." *Genomics* **81**(2): 126-137.
- Wang, Y., S. Sugita, et al. (2000). "The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins." *J Biol Chem* **275**(26): 20033-20044.
- Wang, Z. W. (2008). "Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels." *Mol Neurobiol* **38**(2): 153-166.
- Ward, C. R., D. Faundes, et al. (1999). "The monomeric GTP binding protein, rab3a, is associated with the acrosome in mouse sperm." *Mol Reprod Dev* **53**(4): 413-421.
- Watterson, D. M., S. Mirzoeva, et al. (2001). "Ligand modulation of glial activation: cell permeable, small molecule inhibitors of serine-threonine protein kinases can block induction of interleukin 1 beta and nitric oxide synthase II." *Neurochem Int* **39**(5-6): 459-468.
- Wayman, G. A., Y. S. Lee, et al. (2008). "Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity." *Neuron* **59**(6): 914-931.
- Weimbs, T., S. H. Low, et al. (1997). "A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3046-3051.
- Wennemuth, G., R. E. Westenbroek, et al. (2000). "CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm." *J Biol Chem* **275**(28): 21210-21217.
- Werner, M., R. Von Wasielewski, et al. (1996). "Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry." *Histochem Cell Biol* **105**(4): 253-260.
- Wiederhold, K., T. H. Kloepper, et al. (2010). "A coiled coil trigger site is essential for rapid binding of synaptobrevin to the SNARE acceptor complex." *J Biol Chem* **285**(28): 21549-21559.
- Wilhelm, B. G., S. Mandad, et al. (2014). "Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins." *Science* **344**(6187): 1023-1028.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The caveolin proteins." *Genome Biol* **5**(3): 214.
- Wu, C. F. (1940). "Double-Staining in Toto with Hematoxylin and Eosin." *Science* **92**(2396): 515-516.
- Xia, J. and D. Ren (2009). "Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels." *Biol Reprod* **80**(6): 1092-1098.
- Xie, F., M. A. Garcia, et al. (2006). "Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization." *Dev Biol* **296**(2): 353-362.
- Yamatoya, K., K. Yoshida, et al. (2009). "Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse." *Biol Reprod* **81**(5): 889-897.
- Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." *Zygote* **2**(4): 371-372.
- Yanagimachi, R. (2011). "Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization?" *Biol Reprod* **85**(1): 4-5.
- Yang, E. and H. Schulman (1999). "Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* **274**(37): 26199-26208.
- Yang, L., H. Zhang, et al. (2009). "Optimizing the detergent concentration conditions for immunoprecipitation (IP) coupled with LC-MS/MS identification of interacting proteins." *Analyst* **134**(4): 755-762.
- Yang, X., Y. J. Kaeser-Woo, et al. (2010). "Complexin clamps asynchronous release by blocking a secondary Ca(2+) sensor via its accessory alpha helix." *Neuron* **68**(5): 907-920.
- Yokoyama, C. T., S. J. Myers, et al. (2005). "Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site." *Mol Cell Neurosci* **28**(1): 1-17.
- Yoshimura, Y., Y. Sogawa, et al. (1999). "Protein phosphatase 1 is involved in the dissociation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II from postsynaptic densities." *FEBS Lett* **446**(2-3): 239-242.
- Young, C., P. Grasa, et al. (2009). "Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction." *Fertil Steril* **91**(5 Suppl): 2230-2242.
- Yunes, R., M. Michaut, et al. (2000). "Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa." *Biol Reprod* **62**(4): 1084-1089.
- Yunes, R., C. Tomes, et al. (2002). "Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction." *FEBS Lett* **525**(1-3): 126-130.
- Zanetti, N. and L. S. Mayorga (2009). "Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction." *Biol Reprod* **81**(2): 396-405.
- Zhong, L., J. C. Brown, et al. (2013). "Post-embedding Immunogold labeling of synaptic proteins in hippocampal slice cultures." *J Vis Exp* (74).

- Zhou, J., Y. R. Du, et al. (2009). "RIM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis." Development **136**(3): 373-382.
- Zikich, D., A. Mezer, et al. (2008). "Vesicle priming and recruitment by ubMunc13-2 are differentially regulated by calcium and calmodulin." J Neurosci **28**(8): 1949-1960.
- Zittronski, N., H. Borth, et al. (2010). "The "acrosomal synapse": Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa." Commun Integr Biol **3**(6): 513-521.
- Zitzer, A., E. J. Westover, et al. (2003). "Differential interaction of the two cholesterol-dependent, membrane-damaging toxins, streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin, with enantiomeric cholesterol." FEBS Lett **553**(3): 229-231.
- Zoladz, P. R., C. R. Park, et al. (2012). "Differential expression of molecular markers of synaptic plasticity in the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala in response to spatial learning, predator exposure, and stress-induced amnesia." Hippocampus **22**(3): 577-589.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Zuordnung der diversen Spermienfunktionen zu den einzelnen Abschnitten des weiblichen Genitaltraktes.....	6
Abbildung 3.2: Morphologie eines Mausspermiums.	7
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Pseudovesikelbildung während der Akrosomreaktion.....	11
Abbildung 3.4: Signaltransduktionsprozesse während der Akrosomreaktion.....	13
Abbildung 3.5: SNARE-regulierte Vesikelexozytose.	17
Abbildung 3.6: Netzwerkschema der CAZ-Proteine.	20
Abbildung 3.7: Strukturelle Domänen der Munc13-Isoformen und ihre Bindungspartner.....	21
Abbildung 3.8: Domänenstruktur der RIM-Proteine und ihre Interaktionspartner.....	23
Abbildung 3.9: Strukturelle Domänen der RIM-Bindeproteine.....	25
Abbildung 3.10: Schema der Domänenstruktur von Piccolo/Aczonin und Bassoon.	27
Abbildung 3.11: Aggregation und Umverteilung von <i>membrane rafts</i> während der Kapazitation.....	30
Abbildung 5.1: Schematische Übersicht über die Schichtung des <i>Semi-Dry</i> Transfersystems.....	61
Abbildung 5.2: Schema der Versuchsdurchführung der funktionellen Untersuchungen der Akrosomreaktion an Streptolysin-O permeabilisierten Spermien.	73
Abbildung 5.3: Coomassie-Färbung von Mausspermien.....	76
Abbildung 6.1: Expression und Lokalisation von Bassoon und Piccolo/Aczonin in epididymalen Mausspermien.....	82
Abbildung 6.2: Studien zur funktionellen Beteiligung von Bassoon und Piccolo/Aczonin an der akrosomalen Exozytose von Mausspermien.....	87
Abbildung 6.3: Verteilung des Caveolin-1-Proteins in den Membransubfraktionen von Rattenspermien.....	91
Abbildung 6.4: Immunoblot-Analysen von Bassoon in Membranfraktionen des Cortex und isolierter Spermien der Ratte.....	93
Abbildung 6.5: „Bassoon ist in Präparationen synaptischer Proteine angereichert“ (tom Dieck, Sanmarti-Vila et al. 1998).....	94
Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Munc13-Proteine.....	97
Abbildung 6.7: Expression von Munc13-Subtypen im männlichen Reproduktionsgewebe und in epididymalen Spermien von Nagern.	98
Abbildung 6.8: Identifizierte Peptide des ubMunc13-2-Proteins (Unc-13 Homolog B) in der massenspektrometrischen Analyse von Testis-Immunpräzipitationen.....	99
Abbildung 6.9: Subzelluläre Lokalisation von Munc13 in Mausspermien.....	101
Abbildung 6.10: Ultrastrukturelle Lokalisation von Munc13 in Mausspermien.....	102
Abbildung 6.11: Lokalisation von Munc13 in Detergens-unlöslichen Membranmikrodomänen von epididymalen Spermien der Ratte.....	104
Abbildung 6.12: Funktion der Munc13-Domänen bei der spontanen und Calcium-induzierten Akrosomreaktion von Mausspermien.....	106
Abbildung 6.13: Domänenstruktur der RIM-Proteine.....	110
Abbildung 6.14: RIM2-Expression im männlichen Reproduktionssystem von Mäusen.....	112

Abbildung 6.15: RIM-Expression im männlichen Reproduktionssystem der Ratte.	113
Abbildung 6.16: Elektronenmikroskopische Analyse zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von RIM2 in Ultradünnschnitten von Mausspermien.	116
Abbildung 6.17: Lokalisation von RIM2 in Membransubfraktionen nicht kapazitierter und <i>in vitro</i> kapazitierter Rattenspermien.	119
Abbildung 6.18: <i>In vitro</i> Bindungsstudien von testikulärem Munc13 an RIM2-GST-Fusionsproteine.	122
Abbildung 6.19: <i>In vitro</i> Bindungsstudien von RIM2-GST-Fusionsproteinen und testikulärem RIM-BP3.	124
Abbildung 6.20: Funktionelle Bedeutung verschiedener RIM-Domänen für die Akrosomreaktion.	127
Abbildung 6.21: Immunoblotanalyse zur Überprüfung der RIM2 α -Protein-Defizienz im Hodengewebe RIM2 α - defizienter Mäuse.	129
Abbildung 6.22: Immunhistochemische Analyse der Testes von Wildtyp- und RIM1 α +/- RIM2 α -/- Mäusen.	131
Abbildung 6.23: Testis und Spermatozoa von RIM2 α -defizienten und Wildtyp-Mäusen im Vergleich.	133
Abbildung 6.24: Spontane Akrosomreaktionsrate von RIM2 α -defizienten und Wildtyp-Spermien.	135
Abbildung 6.25: Untersuchung der Calcium- und der <i>Zona pellucida</i> -induzierten Akrosomreaktion von Wildtyp- und RIM2 α -defizienten Spermien.	137
Abbildung 6.26: Immunpräzipitation von RIM2 aus Rattenhodenlysat.	139
Abbildung 6.27: Inhibition der CaMKII α und Analyse der spontanen und Calcium-induzierten Akrosomreaktion in Mausspermien.	145
Abbildung 6.28: Modell zur Aktivierung der CaMKII.	147
Abbildung 6.29: Phosphorylierungszustand der CaMKII α in isolierten Rattenspermien.	149
Abbildung 6.30: <i>In vitro</i> Bindungsstudien von MUPP1 und CaMKII α aus isolierten Spermien.	151
Abbildung 6.31: Untersuchung der Abhängigkeit der CaMKII-MUPP1-Interaktion von der Aktivität der Kinase im Hodenlysat.	152
Abbildung 6.32: Funktion der CaMKII-MUPP1 Interaktion bei der spontanen Akrosomreaktion.	155
Abbildung 6.33: Interaktion von MUPP1-GST-Fusionsproteinen und testikulärem RIM2.	157
Abbildung 7.1: Modellvorstellung zur Rolle von RIM2 als molekularer Knotenpunkt der akrosomalen Synapse.	160
Abbildung 7.2: Potentielles integratives Proteinnetzwerk zur Koordination der multiplen Pseudovesikelbildung während der Akrosomreaktion.	169

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Temperaturbedingungen der β -Aktin-PCR.....	50
Tabelle 5.2: Temperaturbedingungen der <i>Rims2</i> -PCR.....	50
Tabelle 5.3: Temperaturbedingungen für die Sequenzierungs-PCR.....	55
Tabelle 5.4: Acrylamidkonzentrationen von Trenn- und Sammelgel bei verschiedenen molekularen Massen des darzustellenden Proteins.	59
Tabelle 6.1: Analyse der funktionellen Rolle von Bassoon und Piccolo/Aczonin bei der Akrosomreaktion: Experimentelle Ansätze der <i>in vitro</i> Akrosomreaktionsstudien an SLO-permeabilisierten Spermien.....	85
Tabelle 6.2: Massenspektrometrische Identifikation von Immunpräzipitaten aus Rattenhoden.	141

9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<	kleiner als
>	größer als
#	Nummer
A	Ampère
ABC	Avidin/Biotin/Chromogen
AIPII	Autocamtide-2 inhibitory peptide II
Ak	Akrosom
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Akrosomreaktion
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintrisphosphat
ATPase	Adenosintrisphosphat-Hydrolase
BP	Blockierungspeptid
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Ca _v	Spannungs-abhängiger Calcium-Kanal
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CatSper	<i>cationic channel of sperm</i>
CAZ	<i>cytomatrix of the active zone</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO	<i>Cumulus oophorus</i>
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
DRM	Detergens-resistente Membranfraktion
DTT	Dithiotreitol
DYRK1A	<i>dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
ECL	<i>enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELKS	Protein reich an Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)

Abkürzung	Bedeutung
EM	Elektronenmikroskopie
EPAC	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC	ELKS/ <i>Rab6-binding protein</i> /CAST
F _c -Teil	<i>crystallisable fragment</i> ; die konstante, speziesspezifische Region eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fw	<i>forward</i>
g	Gravitationskonstante
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GIT	<i>ADF-ribosylation factor GTPase-activating protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTPase	Guanosintrisphosphat-Hydrolase
Hs	Hauptstück
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
KRB	modifizierte Krebs-Ringer-Lösung
l	Liter
LC-HR-MS/MS	<i>liquid chromatography-high resolution MS/MS</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskop
M	Molar
mA	Milliampère
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight</i>
MARK2	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2</i>
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Ms	Mittelstück
MS	Massenspektrometrie
Munc13	<u>M</u> ammalia-Homolog des <i>Caenorhabditis elegans</i> <u>UNC13</u> Proteins

Abkürzung	Bedeutung
Munc18	Mammalia-Homolog des <i>Caenorhabditis elegans</i> UNC18 Proteins
MUPP1	Multi-PDZ-Domänen Protein 1
MV	<i>mixed vesicles</i>
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NGS	normales Ziegenserum
nm	Nanometer
nM	nanomolar
n.s.	nicht significant
NSF	<i>N-ethylmaleimid-sensitive factor</i>
Nu	Nukleus
OD	optische Dichte
ORAI	griechisch <i>Hōrai</i> ; zu deutsch Horen sind in der griechischen Mythologie die Göttinnen, die Recht und Ordnung wahren und die Himmelstore bewachen
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit in der Statistik
P ₂	Präzipitat 2, crude Membranfraktion
P _{TX}	Präzipitat nach Triton X-100-Behandlung, Detergens-resistente Membranfraktion
PBH	Piccolo-Bassoon-Homologie
p-CaMKIIα	phosphorylierte Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	<i>postsynaptic protein PSD95/Drosophila junction protein discs-large/tight junction protein ZO-1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PMF	Peptidmassen-Fingerabdruck
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
PRA 1	<i>prenylated Rab acceptor 1</i>
PRR	Prolin-reiche Region
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RIM	<i>Rab3 interacting molecule</i>
RIM-BP	<i>Rab3 interacting molecule - binding protein</i>
RNE	<i>redundant nuclear envelope</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRP	<i>readily releasable pool</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
S ₁	<i>supernatant 1</i> , Zellkern-freie Gewebe-/Zellhomogenate
S ₂	<i>supernatant 2</i> , zytoplasmatische Gewebe-/Zellfraktion

Abkürzung	Bedeutung
S _{TX}	<i>supernatant</i> nach Triton X-100-Extraktion, Detergens-lösliche Membranfraktion
sAC	<i>soluble adenylate cyclase</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH3	<i>Src-homology 3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLO	Streptolysin O
Slo	<i>slowpoke potassium channel</i>
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor</i>
s. o.	siehe oben
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
s. u.	siehe unten
SynGAP	synaptisches GTPase aktivierendes Protein
T286	Threonin 286
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TPC	<i>two-pore channel</i>
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
TRPC	<i>transient receptor potential, canonical</i>
U	Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumenprozent
V	Volt
v. a.	vor allem
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
w/v	<i>weight/volume</i> , Massenprozent
WT	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
ZP	<i>Zona peilucida</i>
z. T.	zum Teil

9.4 Publikationsverzeichnis

9.4.1 Originalarbeiten

Weber N, Vieweg L, Henze F, Oprisoreanu A-M, Solinski H J, Breit A, Fecher-Trost C, Schalkowsky P, Wilhelm B, Schoch S, Gudermann T, Boekhoff I: *RIM2alpha is a molecular scaffold for Zona pellucida-induced acrosome reaction*. 2014, Journal of Molecular Cell Biology 6 (5), 434-437

Ackermann F*, **Zittranski N***, Borth H, Buech T, Gudermann T, Boekhoff I: *CaMKIIalpha interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis*. 2009, Journal of Cell Science, 122, 4547-4557

* Die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Ackermann F, **Zittranski N**, Heydecke D, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid-raft associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa*. 2008, Journal of Cellular Physiology, 214, 757-768

9.4.2 Übersichtsartikel

Zittranski N, Borth H, Ackermann F, Meyer D, Vieweg L, Breit A, Gudermann T, Boekhoff I: *The "acrosomal synapse": Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa*. 2010, Communicative and Integrative Biology, 3, 513-521

9.4.3 Tagungsbeiträge

Zittranski N, Ackermann F, Vieweg L, Borth H, Gudermann T, Boekhoff I: *A special form of Ca^{2+} -regulated exocytosis: spontaneous acrosomal secretion is prevented by a CaMKII α -MUPP1 complex in mammalian spermatozoa*. Ninth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, 23. - 27. März 2011

Borth H, Ackermann F, **Zittranski N**, Vieweg L, Gudermann T, Boekhoff I: *The Multi-PDZ domain protein (MUPP1): a neuronal scaffold in sperm acrosomal exocytosis*. Ninth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, 23. - 27. März 2011

Zittranski N, Ackermann F, Borth H, Gudermann T, Boekhoff I: *A special form of Ca^{2+} -regulated exocytosis: spontaneous acrosomal secretion is prevented by a CaMKII α -MUPP1 complex in mammalian spermatozoa*. The Synapse Symposium, Amsterdam, 1. - 3. Juli 2010

Borth H, **Zittranski N**, Ackermann F, Gudermann T, Boekhoff I: *The Multi-PDZ domain Protein (MUPP1): a neuronal scaffold in sperm acrosomal exocytosis*. The Synapse Symposium, Amsterdam, 1. - 3. Juli 2010

Zittranski N, Ackermann F, Borth H, Gudermann T, Boekhoff I: *Die CaMKII α interagiert mit dem Multi-PDZ Domain Protein MUPP1 in Spermien und verhindert eine spontane Akrosomreaktion*. 51. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 23. - 25. März 2010

Zittranski N, Ackermann F, Borth H, Gudermann T, Boekhoff I: *CaMKII α is an interacting partner of MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis*. 2nd European Synapse Meeting, Göttingen, 10. - 13. November 2009

Ackermann F, **Zittranski N**, Borth H, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *Calcium/calmodulin kinase II, a binding partner of the multi PDZ domain protein MUPP1 in mammalian spermatozoa regulates acrosomal exocytosis*. 50. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 10. - 12. März 2009

Ackermann F, **Zittranski N**, Borth H, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *Calcium/calmodulin kinase II, a binding partner of the multi PDZ domain protein MUPP1 in mammalian spermatozoa, regulates acrosomal exocytosis*. 10th ECS Meeting, Leuven, 17. - 20. September 2008

Zittranski N, Ackermann F, Heydecke D, Gudermann T, Boekhoff I: *Calcium/calmodulin kinase II, a binding partner of the Multi PDZ Domain Protein MUPP1 in mammalian spermatozoa, regulates acrosomal exocytosis*. 4. Treffen des wissenschaftlichen Nachwuchses der Studiengruppe „Biochemische Pharmakologie und Toxikologie“ gemeinsam mit der Studiengruppe „Rezeptoren und Signaltransduktion“, Gönzburg, 5. - 6. September 2008

Zitanski N, Ackermann F, Heydecke D, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *The Multi-PDZ Domain Protein MUPP1: a Scaffolding Protein Controlling the Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa*. 31th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Marburg, 12. – 15. März 2008

Ackermann F, **Zitanski N**, Gudermann T, Boekhoff I: *Calcium/Calmodulin Kinase II Regulates Calcium-Induced Acrosomal Exocytosis*. 31th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Marburg, 12. – 15. März 2008

Ackermann F, **Zitanski N**, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *Calcium/calmodulin kinase II, a binding partner of the multi PDZ domain protein MUPP1 in mammalian spermatozoa, regulates calcium-induced acrosomal exocytosis*. 49. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 11. – 13. März 2008

Ackermann F, **Zitanski N**, Meyer D, Heydecke D, Wilhelm B, Gudermann T, Boekhoff I: *The multi PDZ domain protein MUPP1: a scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa*. 48. Jahrestagung der DGPT, Mainz, 13. – 15. März 2007

9.5 Eidesstattliche Versicherung

Weber, Nele

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Akrosomale Exozytose von Säugerspermien: Das synaptische Multidomänenprotein RIM2 α als molekularer Knotenpunkt eines regulatorischen Protein-Netzwerkes“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30. Juli 2014

Nele Weber geb. Zitranski

9.6 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Thomas Gudermann für die Möglichkeit, am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie meine Dissertation anfertigen zu können.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter PD. Dr. Ingrid Boekhoff für die ausgezeichnete Betreuung, unsere intensiven fachlichen Diskussionen und persönlichen Gespräche, die Förderung und Forderung des eigenständigen Denkens, ihre uneingeschränkte Unterstützung und Begeisterung für die Wissenschaft bedanken. Neben der typischen „Ingrid-Sprache“ (Kopf sortieren, reinfuchsen, hinspringen), habe ich fachlich und persönlich unfassbar viel von ihr gelernt. Danke für ALLES, Ingrid!

Den weiteren Gutachtern danke ich im Voraus für ihre Mühe bei der Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Susanne Schoch (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Ana-Maria Oprisoreanu und Ira Hensen, danke ich für das Bereitstellen des RIM2 α -defizienten Mausmodells und die Unterstützung beim Klonieren. Für die hilfreichen Tipps für die Immunpräzipitationsstudien und die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen danke ich Dr. Claudia Fecher-Trost (Universität des Saarlandes). Prof. Dr. Beate Wilhelm und Prof. Dr. Gerhard Aumüller (Philipps-Universität Marburg) danke ich für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Analysen. Für die Bereitstellung von Antikörpern, Plasmiden und Bakterienstämmen danke ich Prof. Guoliang Xu (Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China), Prof. Ronald T. Javier (Baylor College of Medicine, Houston, USA), Prof. Dr. Susanne Schoch (Universität Bonn), Prof. Dr. Michael Bölker (Philipps-Universität Marburg) und PD. Dr. Jürgen Krieger (Universität Hohenheim).

Mein herzlicher Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der Institute in München und Marburg. Insbesondere danke ich Dr. Andreas Breit und Dr. Thomas Büch für die vielfältigen Diskussionen in den BBB-Seminaren und im Kaffeeraum, Marga und Heinz für ihre exzellente Unterstützung und grenzenlose Hilfsbereitschaft, dem Tierstall-Team für seine Unterstützung, Frau Schreier für ihre Hilfe bei spannenden Vertragsverlängerungen und die zuverlässige Puzzle-Versorgung und PD. Dr. Harald Mückter für seine Antworten auf alle möglichen und unmöglichen Fragen.

Mein unendlicher Dank geht an die großartigen „Spermien-Mädels“ Dorke, Heike, Frauke, Laura, Franzi, Andrea, Lilli und Elli. Besonders „Erklärbarin“ Dorke und „gute Seele“ Heike danke ich für ihre fachliche Hilfe und persönliche Unterstützung, ihr immer offenes Ohr, den unerschütterlichen Zusammenhalt, die fantastischen Kuchen, unvergessliche Fremdschäm-Abende und schlicht: ihre Freundschaft. Auch „meiner“ Diplomandin Laura und Bachelorstudentin Franz schulde ich für ihre exzellente Arbeit, genauso wie für die ganz besonders lustigen Arbeitstage und Wochenenden ein riesiges Dankeschön. Franz, ohne Dich wär der R'n'R in München nicht derselbe

gewesen. „Wolle“ Lilli danke ich für den ganz normalen Wahnsinn und ihre Durchsetzungskraft für den guten Musikgeschmack im Labor. Andrea und Elli muss ich für ihren liebevollen Beistand, scharfzüngigen Humor, die täglichen Essens-Erinnerungsanrufe, Jogginghosentage, Wettrunden und „gmiatliche“ Pausen danken.

Bei den Labornachbarn, den „Spermien-Mädels ehrenhalber“ Ellen, Jürgen, Evi, Steffi und Annika möchte ich mich ebenfalls bedanken. Meinem Lieblings-Frühstücks-Gegenüber Ellen danke ich fürs Zentrifugen-Vorkühlen genauso wie für ihre Abfüll-Qualitäten. Außerdem hat Grillmaster Jürgen für seine Hilfsbereitschaft in allen Auswert-Fragen, seine Gastfreundschaft für Palm-Öler und die bloße Anwesenheit der gelben Brotbox meinen Dank verdient. Steffi möchte ich für die ständige Aufmunterung und das großartige Vorbild einer Nicht-den-Kopf-in-den-Sand-Steckerin danken. Obwohl Evi Bayern-Fan ist, danke ich ihr für die morgentlichen Fußballgespräche, den motivierenden Zuspruch und die unvergleichlich (langen) Kaffeepausen. Bei Anni muss ich mich vor allem für die Aufnahme in die beste Quiz-Gemeinschaft der Welt bedanken, aber auch für ihre offenherzige Art und dafür, dass sie unsere Mittagsrunde spinatig bereichert hat. Ohne Euch „Spermien-Mädels“ und „Spermien-Mädels ehrenhalber“ wären Arbeit und Freizeit nicht so großartig gewesen! Ein dickes Dankeschön für's Korrekturlesen und für ihre Freundschaft geht auch an Silke und Bryce.

Ganz besonders möchte ich mich bei Filiz bedanken: Dafür, dass sie vor 31 Jahren nicht müde geworden ist, an unsere Haustür zu klopfen und dafür, dass uns seitdem eine einzigartige Freundschaft verbindet.

Ohne das bloße Wissen um Freunde wie Floriano, die Affenbande Andrea, Anne, Bene, Jen, Larsi, Maari und Sophie hätte diese Arbeit nicht entstehen können. Ich danke Euch für Euren Rückhalt, alle überwundenen Entfernungen für ein Kraft-spendendes Wochenende, albernen Pubertäts-Humor, unvergleichliche Affen-Feste und einfach dafür, dass wir uns gefunden haben!

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken – allen voran meinem geliebten, verstorbenen Vater, der mich schon früh mit seiner Begeisterung für die Biologie angesteckt hat. Meiner Mutter danke ich dafür, dass sie immer auch mein gestresstes Ich ertragen hat und nicht aufhört an mich zu glauben. Mein Bruder wird mir immer ein unerreichbares Vorbild bleiben. Ich danke ihm für seine Engelsgeduld in allen Lebenslagen und für die Gewissheit, dass wir gemeinsam alles meistern werden. Meinen Schwiegereltern Hildegard und Uli sowie Christiane, Andreas und Julia danke ich für die liebevolle Aufnahme in die Zusatzfamilie.

Meinem Mann Werner Weber kann ich kaum jemals für alles danken, deshalb hier nur ein Anfang: Ich danke Dir für unsere Liebe und dafür, dass Du mein Anker bist.